

KALAÖLJYPOHJAISEN ORGANOGEELIN KOOSTUMUS JA  
VALMISTUSPROSESSI

Vilhelmiina Mikkola  
Pro Gradu-tutkielma  
Helsingin Yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmaseuttisen kemian ja  
teknologian osasto  
Teollisuusfarmasia  
Marraskuu 2014



Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Laitos – Institution – Department Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto	
Tekijä – Författare – Author Vilhelmiina Mikkola			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kalaöljypohjaisen organogeelin koostumus ja valmistusprosessi			
Oppiaine – Läroämne – Subject Teollisuusfarmasia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu		Aika – Datum – Month and year Marraskuu 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 128+3
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Organogeeleillä tarkoitetaan geelejä, joiden geelipohja koostuu veden sijaan orgaanisesta liuottimesta. Hydrogeeleihin verrattuna öljypohjaisten organogeeleiden, eli oleogeeleiden, on arvioitu parantavan sekä huonosti veteen liukenevien lääkeaineiden liukoisuutta ja biologista hyötyosuutta että edistävän herkästi veden vaikutuksesta hajoavien lääkeaineiden stabiilisuutta. Nestemäisiin öljypohjaisiin valmisteisiin verrattuna organogeeleiden on lisäksi etenkin eläinlääkinnässä arvioitu helpottavan lääke- ja ravintoaineiden annostelua eläimille, niiden taatessa nestemäisiin öljypohjaisiin valmisteisiin verrattuna aiempaa tarkemman ja stabiilimman annostelualustan.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli kehittää ja optimoida lemmikkieläimille tarkoitetun organogeelipohjaisen ravintotuotteen koostumus ja valmistusprosessi. Ravintotuotteen aktiivikomponentteina työssä käytettiin kalaöljyä ja kiinteitä lääkeaineita, mutta rasvahappojen lähteen lisäksi kalaöljy toimi valmisteissa myös organogeeleiden pohja-aineena. Kalaöljyt sakeutettiin työssä kolloidaalisella piidioksidilla. Kolloidaalisen piidioksidin lisäksi osaan formulaatioista lisättiin piidioksidin geelinmuodostusta tehostaviksi komponenteiksi myös pinta-aktiivisia aineita; krilliöljyä, lesitiiniä tai tokoferolia.</p> <p>Systemaattista koesuunnittelua käytettiin hyväksi koesarjan organogeeliformulaatioiden suunnittelussa. Piidioksidin osalta organogeeleinäytteiden valmistuksessa käytettiin kahta eri piidioksidilaatua ja pinta-aktiivisten aineiden osalta yhteensä seitsemää eri laatua. Valmistettujen organogeeleinäytteiden kolmiulotteista rakennetta tarkasteltiin työssä Cryo-TEM-määritysten avulla. Organogeeleinäytteiden reologiset ominaisuudet määritettiin dynaamisella rotaatioreometrillä 1 viikon ja 3 kk kuluttua näytteiden valmistuksesta.</p> <p>Tässä työssä tehtyjen havaintojen perusteella krilliöljyn sekä lesitiinilaatujen Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA voidaan tietyillä pitoisuustasoilla arvioida tehostavan piidioksidilla sakeutettujen kalaöljypohjaisten seosten sakeutumista pelkkää piidioksidia tai piidioksidia ja tokoferolia sisältäviin formulaatioihin verrattuna. Erityisesti krilliöljyn havaittiin työn perusteella kykenevän sakeuttamaan piidioksidilla sakeutettuja kalaöljyseoksia myös pieniä pitoisuuksia ja matalia leikkausnopeuksia käytettäessä, kun taas pelkkää piidioksidia ja kalaöljyä sisältävien seosten sakeuttamiseen tarvittiin työn perusteella joko korkeita piidioksidipitoisuuksia tai korkeita leikkausnopeuksia.</p> <p>Vaikka krilliöljyn ja lesitiinilaatujen Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA havaittiinkin työssä tietyillä pitoisuustasoilla tehostavan piidioksidipohjaisten kalaöljyseosten sakeutumista, eivät työlle asetetut etukäteisvaatimukset organogeeleiden koostumuksen pastamaisuudesta ja jähmeydestä tai 2 vuoden pituisesta stabiilisuusajasta kuitenkaan toteutuneet toivotusti. Esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella on kuitenkin mahdollista, että käyttämällä organogeeleiden valmistuksessa joko erilaisia krilliöljy- ja kalaöljylaatujen yhdistelmiä tai voimakkaampia sekoitusmenetelmiä, myös jähmeiden ja pastamaisten, stabiilien organogeeleiden muodostaminen voisi ainakin piidioksidin ja krilliöljyn avulla olla mahdollista.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Organogeeli, kalaöljy, piidioksidi, lesitiini, krilliöljy, tokoferoli			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Anne Juppo ja Mikko Griinari			



Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Laitos – Institution – Department Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology	
Tekijä – Författare – Author Vilhelmiina Mikkola			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Composition and manufacturing process of fish oil-based organogel			
Oppiaine – Läroämne – Subject Industrial Pharmacy			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis		Aika – Datum – Month and year November 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 128+3
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Organogels refer to gels whose liquid phase is composed of an organic solvent instead of water. Compared to hydrogels it is estimated that oil based organogels, alias oleogels, are able to improve the solubility and bioavailability of the poorly water-soluble drugs and also to promote the stability of the easily water-degradable drugs. Furthermore, it has been estimated that compared to fluid oil based products organogels are able, especially in veterinary medicine, to facilitate the administration of the drugs and other nutritive substances by guaranteeing more precise and more stable administration platform.</p> <p>The purpose of this work was to develop and to optimize the composition and the manufacturing process of the organogel based nutritional product for pets. Fish oil and solid active pharmaceutical ingredients were used as active components of the nutritional product but in addition for operating as a source of fatty acids fish oil also functioned as a liquid phase of the organogel formulation. In this work the fish oils were thickened with colloidal silicon dioxide. In addition to the silica different surface active agents; krill oil, lecithin or tocopherol; were also added to some of the formulations in order to enhance the gelation property of the colloidal silicon dioxide.</p> <p>Systematic design of experiments was utilized in the planning of the organogel formulation test series. Two different silicon dioxide grades and seven different surface active agents were used in this work. The three-dimensional structure of the organogel samples were examined by Cryo-TEM. The rheological properties of the organogel formulations were determined by dynamic rotation rheometer one week and 3 months after the preparation of the organogel samples.</p> <p>On the basis of the observations that were done in this work, certain levels of krill oil and lecithin grades Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT and Phosal® 75 SA were able to enhance the gelation property of the silica-fish oil mixtures compared to the formulations that contained only plain silica or silica-tocopherol mixtures. Especially krill oil was found to be able to enhance the thickening effect of the silica-fish oil mixtures even when small concentrations and low shear rates were used whereas either high silica contents or high shear rates were needed to thicken the pure fish oil-silica mixtures.</p> <p>Although krill oil and lecithin grades Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT and Phosal® 75 SA were, in certain concentration levels, able to enhance the thickening effect of the silica-based fish oil mixtures the pre-demands of the paste-like consistency, solidity and 2 years stability time were not fulfilled as desired. On the basis of the observations that were done in the pre-tests, it is however possible that either by using different krill oil and fish oil combinations or by using higher shear methods it could be possible to form the desired, stiff, paste-like, stable organogels at least with the help of krill oil and colloidal silicon dioxide.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Organogel, fish oil, silicon dioxide, lecithin, krill oil, tocopherol			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Anne Juppo and Mikko Griinari			

## SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. ÖLJYJEN SAKEUTTAMINEN.....	2
2.1 Emulsiosysteemit .....	3
2.2 Polymeerit ja vahat .....	4
2.3 Muut menetelmät .....	7
3. ORGANOGEELIT .....	7
3.1 Organogeelien geelinmuodostajat.....	8
3.1.1 Pienimolekyylipainoiset organogelaattorit .....	10
3.1.2 Polymeeriset organogelaattorit .....	12
3.2 Organogeelien rakenne ja muodostuminen.....	14
3.3 Organogeelien fysikaaliskemialliset ominaisuudet .....	16
3.3.1 Viskoelastisuus .....	16
3.3.2 Kahtaistaitteisuus .....	17
3.3.3 Lämpöpalautuvuus.....	17
3.3.4 Termostabiilisuus.....	18
3.3.5 Optinen kirkkaus.....	18
3.3.6 Kiraalisuus .....	19
3.3.7 Bioyhteensopivuus .....	19
3.4 Organogeelien ja organogelaattorien analysointi .....	19
3.4.1 Kriittinen geelinmuodostajan konsentraatio .....	20
3.4.2 Kriittinen muodostumislämpötila .....	20
3.4.3 Fysikaalinen stabiilisuus .....	21
3.4.4 Muut analyysit .....	22
3.5 Geelit farmaseuttisina valmisteina.....	25
3.5.1 Organogeelit oraalisisä valmisteina.....	25
3.5.2 Organogeelit eläinlääkinnässä .....	26
4. KALAÖLJY ORGANOGEELIEN GEELIPOHJANA.....	29
4.1 Kalaöljyn terveysvaikutukset.....	29
4.2 Kalaöljy organogeeleissä .....	30
5. PIIDIOKSIDI JA LESITIINI ORGANOGEELAATTOREINA .....	31
5.1 Piidioksidi .....	31
5.1.1 Ominaisuudet .....	32
5.1.2 Piidioksidi organogelaattorina .....	34
5.1.3 Kiinteiden silikarakenteiden muodostuminen .....	37
5.2 Lesitiini .....	37
5.2.1 Ominaisuudet .....	38
5.2.2 Lesitiini organogelaattorina .....	39
5.3 Lesitiini ja piidioksidi sakeuttamisaineina yhdessä .....	44
6. ORGANOGEELIEN VALMISTUS.....	45
6.1 Sakeuttamisaineiden määrät ja laadut.....	47
6.1.1 Piidioksidi .....	47
6.1.2 Lesitiini .....	49
6.2 Organogeelien valmistusprosessit.....	51
6.2.1 Piidioksidi .....	52
6.2.2 Lesitiini .....	54
7. TYÖN TARKOITUS.....	56

8. MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	57
8.1 Materiaalit .....	57
8.1.1 Kondroitiinisulfaatti .....	57
8.1.2 Glukosamiini .....	58
8.1.3 Kalaöljy, piidioksidi ja lesitiini .....	59
8.1.4 Tokoferoli .....	62
8.2 Esikokeet .....	62
8.2.1 Komponenttien lisäysjärjestys .....	63
8.2.2 Sekoituselementtien ja sekoitusolosuhteiden valinta .....	64
8.2.3 Lesitiinin määrä .....	65
8.2.4 Piidioksidin laatu ja määrä .....	66
8.2.5 Stabiilisuus .....	67
8.3 Koesuunnittelu .....	67
8.4 Näytteiden valmistus, pakkaaminen ja säilytys .....	70
8.5 Analyysit .....	73
8.5.1 Dynaaminen rotaatioreometri .....	74
8.5.2 Cryo-TEM .....	76
9. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	78
9.1 Esikokeiden tulokset .....	78
9.1.1 Komponenttien lisäysjärjestys .....	78
9.1.2 Ultra Turrax .....	79
9.1.3 Tehosekoitin .....	82
9.1.4 Yleiskone .....	83
9.1.5 Sekoitusaika .....	84
9.1.6 Lesitiinin määrä .....	85
9.1.7 Piidioksidin määrä ja laatu .....	86
9.1.8 Stabiilisuus .....	88
9.2 Organogeelinäytteiden geeliytyminen ja erottuminen .....	88
9.3 Reologiset mittaukset .....	90
9.3.1 Krilliöljy .....	93
9.3.2 Muut lesitiinilaadut .....	97
9.3.3 Tokoferoli .....	101
9.3.4 Piidioksidin määrä .....	102
9.3.5 Sekoituselementti .....	103
9.3.6 Piidioksidilaatu .....	105
9.3.7 Näytteiden stabiilisuus .....	107
9.3.8 Näytteiden virtausominaisuudet .....	109
9.4 Cryo-TEM .....	110
9.5 Mahdolliset virhelähteet .....	112
9.6 Yhteenveto .....	114
10. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	115
11. KIRJALLISUUSLUETTELO .....	117

## LIITTEET

### LIITE 1 Tehdyt esikokeet

## 1. JOHDANTO

Organogeeleillä tarkoitetaan geelejä, joiden geelipohja koostuu veden sijaan orgaanisesta liuottimesta (Vintilou ja Leroux 2008). Organogeeelit muodostuvat kun niiden geelinmuodostajat, organogelaattorit, järjestäytyvät orgaanisissa liuottimissa toisiinsa liittyneiden säikeiden avulla kolmiulotteisiksi verkostoiksi, jotka immobilisoivat orgaanista liuotinta. Vaikka organogeeelit muodostuvatkin pääsääntöisesti nestemäisistä yhdisteistä, muistuttavat ne ulkonäöltään ja reologisilta ominaisuuksiltaan kuitenkin enemmän kiinteitä aineita kuin nesteitä.

Kiinnostus ja tutkimus organogeelejä kohtaan on viime vuosikymmeninä lisääntynyt jatkuvasti (Vintilou ja Leroux 2008). Tutkimuksissa huomiota on kiinnitetty erityisesti erilaisiin öljypohjaisiin organogeeleihin, joiden avulla huonosti veteen liukenevien lääkeaineiden liukoisuutta ja biologista hyötyosuutta sekä herkästi veden vaikutuksesta hajoavien lääkeaineiden stabiilisuutta on yritetty tehostaa. Organogeelien käyttö farmaseuttisissa sovelluksissa on tutkimuksista huolimatta ollut vielä melko harvinaista johtuen pääasiassa siitä, että useimpien organogeelien geelipohjina ja geelinmuodostajina käytettyjen yhdisteiden turvallisuudesta on vasta vähän tietoa saatavilla.

Kosteuden indusoiman hajoamisen minimoimiseksi ja valmisteiden säilyvyyden maksimoimiseksi lemmikkieläimille tarkoitetut lääke- ja ravintovalmisteet on perinteisesti formuloitu joko jauhe- tai tablettimuotoisiksi, kiinteiksi ja kuiviksi lopputuotteiksi (Baggot ja Brown 1998). Tablettimuotoisten valmisteiden annostelu eläimille on kuitenkin koettu kuluttajien kannalta haasteelliseksi, minkä vuoksi kiinteitä lääkeaineita on sittemmin kovien, nieltävien tablettien sijaan pyritty formuloimaan myös pehmeiksi purutableteiksi. Joidenkin pehmeiden purutablettien ongelmana on kuitenkin niiden sisältämä kosteus, joka saattaa heikentää lääkeaineiden stabiilisuutta ja lyhentää valmisteiden säilyvyyttä. Usein pehmeisiin purutablettiformulaatioihin joudutaan tavallisten tablettiapuaineiden lisäksi liittämään oheen myös muita apuaineita, mikä lisää sekä prosessivaiheita että nostaa usein myös valmisteiden kustannuksia. Näiden ongelmien selvittämiseksi on sittemmin yritetty löytää ratkaisua uusista

lääkemuodoista. Tässä työssä käsiteltyt oraaliset organogeelit luovat stabiilin pohjan kiinteiden lääkeaineiden annostelulle. Stabiiliuden lisäksi ne tarjoavat mahdollisuuden helppoon, tarkkaan ja maistuvaan lääke- ja ravintoaineiden annosteluun eläimille ja miksei ihmisillekin.

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää ja optimoida lemmikkieläimille tarkoitettun organogeelipohjaisen ravintotuotteen koostumus ja valmistusprosessi. Ravintotuotteen aktiivikomponentteina työssä käytettiin kalaöljyä ja kiinteitä lääkeaineita, mutta rasvahappojen lähteen lisäksi kalaöljy toimi valmisteissa myös organogeelien pohjaineena. Kalaöljyt sakeutettiin työssä kolloidaalisella piidioksidilla. Kolloidaalisen piidioksidin lisäksi osaan formulaatioista lisättiin piidioksidin geelinmuodostusta tehostaviksi komponenteiksi myös pinta-aktiivisia aineita; krilliöljyä, lesitiiniä tai tokoferolia. Kiinteinä lääkeaineina työssä käytettiin kondroitiinisulfaattia ja glukosamiinia. Optimaalisten sakeuttamisaineiden määrien ja laatujen arvioimisen lisäksi työn tarkoituksena oli kehittää työssä valmistetuille organogeeleille soveltuva laboratoriomittakaavainen valmistusprosessi.

## 2. ÖLJYJEN SAKEUTTAMINEN

Kalaöljyn sisältämien omega-3-rasvahappojen ja tässä työssä käytettyjen kiinteiden, niveliä suojaavien, lääkeaineiden välillä on havaittu synerginen vaikutus (Gruenwald ym. 2009; Jerosch 2011). Yhdisteitä voidaan käyttää samassa valmisteessa tehostamaan nivelten hyvinvointia, mutta koska kondroitiinisulfaatti ja glukosamiini ovat kalaöljyyn liukenemattomia, tulee kalaöljyt sedimentoitumisen ehkäisemiseksi sakeuttaa ennen kiinteiden lääkeaineiden lisäämistä. Kiinteitä lääkeaineita sisältävät sakeutetut öljyt on perinteisesti kapseloitu. Kapseleiden annostelu lemmikkieläimille on kuitenkin koettu kuluttajien kannalta haasteellisena, minkä vuoksi öljyn ja kiinteiden lääkeaineiden yhdistämistä tahnamaiseksi, tuubiin pakattavaksi lopputuotteeksi pidetään tämän työn kannalta toivottavampana.

Yksi vaihtoehto kiinteiden lääkeaineiden ja nestemäisen kalaöljyn yhdistämiselle on käyttää formulaatioiden pohjana puolikiinteää geelipohjaa. Öljyjä on geelien ohella mahdollista sakeuttaa myös erilaisten emulsiosysteemien, polymeerien tai vahojen avulla (Martino ja Morawsky 1997; Pedersen ja Rønningsen 2000; Katsuda ym. 2008). Muihin systeemeihin verrattuna organogeelien vahvuuksia ovat niissä tarvittavat matalat apuaineiden pitoisuudet sekä mahdollisuus valmistaa lopputuotteet vedettömissä ja joissakin tapauksissa myös huoneenlämpöisissä olosuhteissa. Tässä kappaleessa on tarkasteltu erilaisia öljyjen sakeuttamisessa käytettyjä menetelmiä. Organogeelejä on tarkasteltu myöhemmissä luvuissa yksityiskohtaisesti, joten niiden käsittely on jätetty tämän kappaleen ulkopuolelle.

## 2.1 Emulsiosysteemit

Öljyjä ja niihin liukenemattomia kiinteitä lääkeaineita on onnistuneesti yhdistetty erilaisissa emulsiosysteemeissä jo kauan ennen organogeelien kehityksen ensiaskelia. Emulsiot muodostuvat kahdesta toisiinsa sekoittumattomasta nesteestä, tavallisesti vedestä ja jostakin öljystä, joista toinen toimii emulsioiden ulkoisena, jatkuvana, faasina ja toinen ulkoiseen faasiin pieninä pallosina dispergoituneena sisäisenä faasina. Ulkoisen ja sisäisen faasin perusteella emulsiot voidaan jakaa kahteen pääluokkaan: öljy vedessä (ö/v)- ja vesi öljyssä (v/ö)-emulsioihin. Veden ja öljyn lisäksi emulsiosysteemeihin lisätään tavallisesti emulgaattoreita stabiloimaan muodostuneita emulsiotiloja. Emulgaattorit stabiloivat emulsiotiloja estämällä emulsioiden sisäisen faasin pallostien yhdistymistä pienentämällä vesi- ja öljyfaasien välistä pintajännitystä. Emulgaattoreiden lisäksi systeemien stabiilisuutta voidaan parantaa myös viskositeettia kohottavilla aineilla, jolloin emulsiotilojen stabilointivaikutus saadaan aikaan hidastamalla emulsion sisäisen faasin pallostien liikettä ulkoisessa faasissa. Myös kiinteitä, steerisen esteen pallostien välille muodostavia yhdisteitä on käytetty emulsiotilojen stabiloinnissa (Sztukowski ja Yarranton 2005).

Öljyyn liukenemattomat kiinteät lääkeaineet ovat usein vesiliukoisia ja näin ollen mahdollista liuottaa emulsiosysteemien vesifaaseihin, jolloin kiinteiden lääkeaineiden sedimentoituminen säilytysastioiden pohjalle heikkenee huomattavasti. Usein tällaisissa



tilanteissa käytetään öljypohjaisia v/ö-emulsioita, joissa aktiiviaineen asemassa toimiva öljy lisätään systeemeihin ulkoiseksi faasiksi ja kiinteitä lääkeaineita sisältävä vesifaasi formuloidaan öljyn sekaan emulsioiden sisäiseksi faasiksi (Martino ja Morawsky 1997). Myös vesipohjaisia ö/v-emulsioita on kuitenkin havaittu olevan mahdollista käyttää, sillä ö/v-emulsioiden öljyfaasin osuutta on joissakin tutkimuksissa osoitettu olevan mahdollista kasvattaa jopa 80 % asti (Osborn ja Akoh 2004).

Vaikka öljyjen ja niihin liukenemattomien kiinteiden lääkeaineiden yhdistäminen erilaisissa emulsiosysteemeissä onkin suhteellisen helppoa, on emulsiosysteemeillä kuitenkin omat haasteensa. Emulsiosysteemien ongelmana ovat erityisesti niille tyypillisestä hapettumisesta johtuva huono kemiallinen stabiilisuus sekä mikrobien lisääntymiselle välttämättömän veden suurehkosta määrästä johtuva heikentynyt mikrobiologinen stabiilisuus (Verrips ja Zaalberg 1980; Katsuda ym. 2008). Kalaöljypohjaisten emulsiosysteemien on havaittu olevan erityisen herkkiä hapettumiselle niihin lisätyistä stabiloivista yhdisteistä huolimatta (Katsuda ym. 2008). Sekä öljyjen että emulgaattoreiden pitoisuuksien on havaittu vaikuttavan ö/v-emulsiosysteemien öljyjen hapettumiseen, hapettumisen ollessa todennäköisempää pienemmillä pitoisuuksilla (Fomuso ym. 2002; Osborn ja Akoh 2004). Myös emulgaattoreiden luonteella on havaittu olevan vaikutusta emulsioiden stabiilisuuteen, lesitiiniä emulgaattoreina sisältävien systeemien kermoituessa mono- tai diasyylyglyserolia tai Tween 20:a sisältäviä systeemejä huomattavasti nopeammin (Fomuso ym. 2002). Oletetusta poiketen emulsiosysteemien sisäisen faasin pallosten koon ei kuitenkaan ole havaittu vaikuttavan öljyjen hapettumiseen (Osborn ja Akoh 2004). Vaikka kalaöljypohjaisia emulsioita onkin mahdollista stabiloida ja suojata hapettumiselta esimerkiksi pektiinien avulla, voidaan emulsiosysteemien edellä kuvatun mukaisesti arvioida kuitenkin olevan organogeeleihin verrattuna suhteellisen epästabiileja systeemejä (Katsuda ym. 2008).

## 2.2 Polymeerit ja vahat

Öljyjen sakeuttaminen on emulsiosysteemien ja geelinmuodostajien lisäksi mahdollista toteuttaa myös polymeerien tai vahojen avulla (Martino ja Morawsky 1997; Pedersen ja

Rønningsen 2000). Kun vahamaisten aineiden konsentraatio öljypohjaisissa seoksissa nostetaan riittävän korkeaksi, on suspensioiden valumiskäyttäytymisen havaittu muuttuvan newtonisesta virtauksesta ei-newtoniseksi virtaukseksi (Pedersen ja Rønningsen 2000). Newtonisesti virtaavalla nesteellä tarkoitetaan nestettä, joka alkaa valua, kun sitä vastaan kohdistetaan jännitystä, mutta jonka valuminen pysähtyy, kun lisätty jännitys poistetaan (Morrison 2001). Myös ei-newtonisten nesteiden viskositeetti on riippuvainen niihin kohdistuvasta leikkausjännityksestä. Ei-newtoniset nesteet eroavat kuitenkin newtonisista nesteistä joko jännityksen lisäämiseen ja/tai poistamiseen liittyvien viskositeettimuutosten perusteella. Vahoilla muutoksen newtonisesta virtauksesta ei-newtoniseksi virtaukseksi on havaittu tapahtuvan noin 1–2 % (m/m) vahapitoisuuksilla 10–15 °C samepisteen (*wax appearance temperature*) alapuolella (Pedersen ja Rønningsen 2000). Kun vahojen pitoisuutta öljypohjaisissa seoksissa on tämän jälkeen edelleen kasvatettu noin 4–5 %:iin (m/m) ja seoksia edelleen jäähdytetty lähemmäksi vahojen jäähmepistettä (*pour point*), on seosten havaittu muuttuvan koostumukseltaan geelimäisiksi, kiinteän kaltaisiksi rakenteiksi.

Luonnosta peräisin olevia ja synteettisiä vahoja on käytetty myös nestemäisten kalaöljyjen sakeuttamisessa (Yan 2004; Langford 2011). Vahoilla sakeutettujen kalaöljyjen on arvioitu olevan muilla sakeuttamismenetelmillä sakeutettuja kalaöljyjä kiiltävämpiä ja esteettisesti kauniimpia (Langford 2011). Yan (2004) käytti kalaöljyjä sakeuttaessaan mehiläisvahan osalta 17 % (m/m) vahapitoisuuksia, kun taas Blake (2014) tutkimusryhmineen arveli eräiden vaha- ja öljylaatujen yhdistelmien osalta myös huomattavasti pienempien, vain 1–4 % kasvivahapitoisuuksien, olevan öljyjen sakeuttamisen kannalta riittäviä.

Vahoilla sakeutettuja kalaöljyjä on Langfordin (2011) havaintojen perusteella mahdollista valmistaa erilaisilla menetelmillä. Tavallisesti sakeutetut kalaöljyt valmistetaan lämmittämällä nestemäinen öljypohja noin 50–90 °C:seen ja lisäämällä kiinteässä muodossa oleva vaha lämmitetyn öljyn sekaan voimakkaasti sekoittaen (Langford 2011; Blake ym. 2014). Vahan lisääminen lämpimään öljypohjaan saa aikaan vahan sulamisen ja seosten jäähtyessä sakeiden öljyjen muodostumisen. Lämmittämisen lisäksi sakeita öljyjä on havaittu olevan mahdollista valmistaa myös ilman erillistä

lämmitysvaihetta (Langford 2011). Tällöin valmistuksessa tulee käyttää voimakkaita sekoituselementtejä, jolloin sekoituselementtien voimakas mekaaninen sekoitusvoima saa seosten lämpötilan nousemaan vahojen sulamispisteen yläpuolelle. Langfordin patentin tutkimuksissa kalaöljyjen viskositeettien havaittiin nousevan noin 12 300 cP asti, kun kalaöljyjen sakeuttamisessa käytettiin 25 % (m/m) vahapitoisuuksia. Kuten luvusta 6.1.1 nähdään, ovat vahojen viskositeettia kohottavat ominaisuudet kuitenkin selkeästi esimerkiksi piidioksidin viskositeettia kohottavia ominaisuuksia heikompia. Vahoja voidaan käyttää öljyjen sakeuttamisessa joko yksinään, tai ne voidaan yhdistää muiden sakeuttavien aineiden kanssa riittävän viskositeettiasteen saavuttamiseksi. Niiden heikkouksina pidetään joidenkin öljylaatujen sakeuttamisessa tarvittavia suuria apuainepitoisuuksia sekä valmistusprosessien lämmön tarvetta. Toisaalta joidenkin vaha- ja öljylaatuyhdistelmien osalta myös pienten apuainepitoisuuksien käyttö on osoitettu mahdolliseksi (Blake ym. 2014). Tämän ominaisuuden lisäksi vahojen vahvuuksina pidetään niiden turvallisuutta sekä helppoa saatavuutta.

Emulsiosysteemien ja vahojen lisäksi öljyjen sakeuttamisessa on mahdollista käyttää myös polymeerejä. Martino ja Morawsky (1997) käyttivät patentissaan menetelmää, jossa öljyt sakeutettiin kopolymeereillä, jotka olivat riittävän hydrofobisia taatakseen kopolymeerien osittaisen liukenemisen, mutta toisaalta riittävän hydrofiilisiä saadakseen aikaan öljyjen sakeutumisen. Kopolymeerien hydrofobisen luonteen ja osittaisen öljyihin liukenemisen on arveltu olevan systeemien stabiilisuuden kannalta keskeistä. Patentissa kopolymeerien hydrofobisina osina käytettiin muun muassa C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-akrylaatteja ja -metakrylaatteja sekä C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-vinyyliestereitä ja -estereitä, kun taas kopolymeerien hydrofiilisinä osina toimivat C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>-tydyttymättömät karboksyyliidihapot tai näiden karboksyyliidihappojen monoesterit tai monoamidit. Kopolymeerien vahvuuksina pidetään niiden liukoisuutta ja stabiilisuutta sekä kykyä sakeuttaa seoksia myös matalilla apuainepitoisuuksilla. Kopolymeerien heikkoutena etenkin öljyjen sakeuttamisen kannalta ovat kuitenkin niiden valmistuksessa tarvittavat korkeahkot lämpötilat, jotka saattavat heikentää öljypohjaisten systeemien stabiilisuutta. Kopolymeereillä sakeutettuja öljyjä on mahdollista käyttää pohja-aineina ainakin erilaisissa voide-, geeli- ja emulsiopohjaisissa systeemeissä.

## 2.3 Muut menetelmät

Yllä esitettyjen menetelmien lisäksi öljypohjaisten seosten sakeuttamisessa voidaan lamellaaristen nestekiteiden muodostamiskykynsä perusteella käyttää myös kiteisiä aineita (Eger ym. 2003). Kiteisistä aineista ainakin fosfolipidien, rasvahappojen glyseroliestereiden, propyleeniglykoliestereiden, rasvahappojen sokeriestereiden sekä natrium- ja kaliumstearoyylilaktylaattien, on öljypohjaisissa seoksissa havaittu muodostavan lamellaarisia nestekiteitä toivotusti. Öljyjen sakeutumistasen on kiteisillä aineilla havaittu olevan tehokkaimmillaan kiteisen aineen ja öljyn välisen suhteen ollessa 1:12–1:24. Kuten vahojen ja polymeerienkin kohdalla, kiteisten aineiden ongelmana ovat öljyjen sakeuttamisessa tarvittavat korkeahkot, noin 45–75 °C, lämpötilat. Vaikka kiteisten aineiden liuottamisessa joudutaankin tyypillisesti käyttämään melko korkeita lämpötiloja, on kiteisten aineiden formulointi stabiilisuuden tehostamiseksi kuitenkin mahdollista suorittaa täysin vedettömissä olosuhteissa.

Kiteisten aineiden lisäksi öljyjen sakeuttamisessa voidaan käyttää myös epäorgaanisia kompleksoivia yhdisteitä, jotka öljyjen kanssa vuorovaikuttaessaan saavat kompleksien muodostumisen seurauksena aikaan heikkoja geelimäisiä rakenteita (Geria 1988). Kompleksoivina yhdisteinä öljyjen sakeuttamisessa on käytetty muun muassa öljyyn liukenemattomia magnesiumtrisilikaattia ja -hydroksidia sekä kalsiumkarbonaattia ja -silikaattia. Epäorgaanisten kompleksoivien yhdisteiden etuna on, että niiden lisääminen öljyihin on kiteisistä aineista, vahoista ja polymeereistä poiketen mahdollista toteuttaa myös huoneenlämpöisissä olosuhteissa.

## 3. ORGANOGEELIT

Farmaseuttiset geelit ovat puolikiinteitä valmisteita, jotka muodostuvat nesteestä ja siihen sopivasta geelinmuodostajasta (Balasubramanian ym. 2012). Ne voidaan geelipohjana käytetyn nesteen luonteesta riippuen jakaa kahteen pääluokkaan: vettä sisältäviin ja ei-vesipohjaisiin, orgaanisia liuottimia sisältäviin, geeleihin. Vesipohjaisista geeleistä käytetään tyypillisesti nimitystä hydrogeeli. Orgaanisia

liuottimia sisältäviä lipofiilisiä geelejä, joiden geelipohja koostuu pääsääntöisesti joko nestemäisestä parafiinista tai jostakin kasvi- tai eläinperäisestä öljystä, kutsutaan puolestaan organo- tai oleogeeleiksi. Termejä organo- ja oleogeeli käytetään usein ristiin kuvaamaan geelejä, joiden geelipohja koostuu ei-vesimäisestä liuottimesta (Penzés 2005). Tarkasti ottaen organogeeleillä tarkoitetaan kuitenkin geelejä, joiden dispergoiva faasi on ei-vesipohjainen ja oleogeeleillä puolestaan geelejä, joiden geelipohjana toimii öljymäinen aine. Orgaanisten yhdisteiden ja veden lisäksi geelien väliaineena voidaan käyttää myös ilmaa (Hrubesh 1998). Geeleistä, joiden väliaineena toimii ilma, käytetään tyypillisesti nimitystä aerogeeli.

Organogeelien vahvuuksina pidetään niiden yksinkertaista valmistusprosessia, edullisia tuotantokustannuksia, suhteellisen pitkiä säilyvyysaikoja sekä mahdollisuutta formuloida geelipohjiin niin hydrofiilisiä kuin hydrofobisiakin lääkeaineita (Jadhav ym. 2012). Matalasta vesipitoisuudesta johtuen organogeelien vahvuuksiksi voidaan lukea myös niiden kyky vastustaa lopputuotteiden mikrobiologista kontaminaatiota. Lisäksi organogeelien on etenkin eläinlääkinnässä arvioitu helpottavan lääke- ja ravintoaineiden annostelua lemmikkieläimille, niiden taatessa nestemäisiin öljypohjaisiin valmisteisiin verrattuna aiempaa tarkemman ja stabiilimman annostelualustan. Useista vahvuuksistaan huolimatta organogeeleillä tiedetään kuitenkin olevan myös joitakin heikkouksia. Tärkeimpiä organogeelien käyttöä rajoittavia tekijöitä ovat niiden suhteellisen tarkka säilytyslämpötila, tietyissä sovelluskohteissa ilmi tullut epämiellyttävä ja rasvainen koostumus sekä mahdollinen säilytyksenaikainen synereesi eli nesteen erottuminen kiinteästä geelipohjasta (Jadhav ym. 2012).

### 3.1 Organogeelien geelinmuodostajat

Farmaseuttisten geelien geelinmuodostajat ovat pääsääntöisesti suurimolekyyllisiä orgaanisia tai epäorgaanisia yhdisteitä, jotka geelipohjan nestemäisen aineen kanssa vuorovaikuttaessaan saavat aikaan geelirakenteiden muodostumista. Hydrogeelien geelinmuodostajina voidaan käyttää joko luonnosta peräisin olevia yhdisteitä kuten liivatetta, agaria, arabikumia tai traganttia; puolisynteettisiä selluloosajohdoksia kuten hydroksipropyyliselluloosaa tai natriumkarboksimeetyli-selluloosaa; tai synteettisiä

yhdisteitä kuten karboksivinyylipolymeerejä tai polyvinyylipyrrolidonia (Balasubramanian ym. 2012). Tässä työssä käsiteltyjen organogeelien geelinmuodostajina käytetään edellä esitettyihin hydrogeelien geelinmuodostajiin nähden kuitenkin täysin erilaisia yhdisteitä. Yleisesti ottaen organogeelien geelinmuodostajina käytettyjen yhdisteiden on havaittu olevan hydrogeelien geelinmuodostajiin nähden huomattavasti pienikokoisempia (Wright ja Marangoni 2011).

Orgaanisten liuotin- ja geelinmuodostajamolekyylien välisen affiniteetin on havaittu vaikuttavan organogeelien stabiilisuuteen keskeisesti (Zhu ja Dordick 2006). Zhu ja Dordick havaitsivat orgaanisten liuottimien vaikutusta trehaloosidiesteri-organogeeleissä tutkiessaan liuottimien polaarisuuden ja gelaattorimolekyylien luonteen vaikuttavan organogeelien muodostumiseen keskeisesti. Hyvän geelitymisen edellytyksenä pidettiin rajallista vuorovaikutusta gelaattorimolekyylien ja liuotinmolekyylien välillä, koska tällöin liuotin- ja gelaattorimolekyylien välisten vuorovaikutusten havaittiin saavan aikaan ohuita ja joustavia, toistensa ympärille voimakkaasti kietoutuneita säiemäisiä rakenteita. Kun liuotin- ja gelaattorimolekyylien välinen vuorovaikutus oli voimakas, havaittiin gelaattorimolekyylien puolestaan muodostavan suuria ryhmittymiä ja tämän seurauksena myös vähemmän stabiileja geelirakenteita.

Organo- tai oleogeelien geelinmuodostajat, organogelaattorit, voidaan karkeasti ottaen jakaa joko yhdestä tai kahdesta komponentista riippuvaisiin organogelaattoreihin (Balasubramanian ym. 2012). Yhdestä komponentista riippuvaiset organogelaattorit ovat riippuvaisia vain geelipohjana käytetystä orgaanisesta liuottimesta, kun taas kaksikomponentti-organogelaattorit tarvitsevat orgaanisten liuottimien lisäksi myös muita yhdisteitä geelityäkseen. Tässä työssä kalaöljyjen sakeuttamisessa käytetyistä yhdisteistä piidioksidin on havaittu olevan riippuvainen vain orgaanisesta geelipohjasta, kun taas lesitiini tarvitsee tavallisesti geelityäkseen geelipohjan lisäksi myös muita, tavallisesti polaarisia, yhdisteitä (Vintiloiu ja Leroux 2008; Balasubramanian ym. 2012).

Toinen perinteinen organogelaattorien jako perustuu geelinmuodostajien molekyylipainoon (Balasubramanian ym. 2012). Molekyylipainon mukaan organogelaattorit voidaan jakaa joko pienimolekyylipainoisiin (*low molecular weight organogelators*) tai polymeerisiin organogelaattoreihin (*polymeric organogelators*). Organogelaattorimolekyylien steerisellä vaikutuksella, jäykkyydellä ja polaarisuudella on havaittu olevan vaikutusta sekä pienimolekyylipainoisten että polymeeristen organogelaattorien kykyyn aggregoitua (Vintiloiu ja Leroux 2008).

### 3.1.1 Pienimolekyylipainoiset organogelaattorit

Pienimolekyylipainoiset organogelaattorit ovat pieniä, tyypillisesti alle 3000 Da painoisia molekyylejä, jotka muodostavat orgaanisten liuottimien kanssa stabiileja geelejä suhteellisen matalilla, jopa alle 2 % (m/m), pitoisuuksilla (Abdallah ja Weiss 2000; Penzés 2005). Muodostuvien aggregaattien kineettisten ominaisuuksien perusteella pienimolekyylipainoiset organogelaattorit voidaan jakaa kahteen pääryhmään: vahvoja kiinteitä säieverkostoja sekä heikompia nestemäisiä säieverkostoja muodostaviin organogelaattoreihin (Vintiloiu ja Leroux 2008). Suurin osa pienimolekyylipainoisista organogelaattoreista muodostaa kiinteitä säieverkostoja. Kiinteistä säieverkostoista muodostuvat geelit ovat pääsääntöisesti nestemäisistä säieverkostoista muodostuvia geelejä kestävämpiä. Tämän on arveltu johtuvan kiinteiden säikeiden muodostamista pysyvistä säieverkostoista, joissa säieverkostojen liitoskohdat koostuvat suhteellisen suurista kiteisistä mikroalueista. Kiinteistä säikeistä poiketen, nestemäisten säikeiden on puolestaan havaittu muodostavan väliaikaisia säieverkostoja, joissa liitoskohdat muodostuvat tyypillisesti vain yksinkertaisista ketjujen kietoutumisista. Nestemäisistä säikeistä muodostuvien organogeelien heikkoutta lisää se, että gelaattorimolekyylien dynaaminen vaihtuminen geelipohjan nesteen kanssa sekä ketjujen katkeaminen ja uudelleenmuodostuminen ovat mahdollisia. Geelien kestävyys ja stabiiliuden lisäksi myös organogeelien fysikaalisten ominaisuuksien on havaittu riippuvan säieverkostojen olomuodosta voimakkaasti.

Pienimolekyylipainoisten organogelaattorien vahvuuksina pidetään niiden edullisia kustannuksia, pientä ympäristövaikutusta sekä suhteellisen helppoa synteesiä (Craythorne ym. 2009). Yksinkertaisimpia pienimolekyylipainoisia organogelaattoreja ovat pienimolekyylipainoiset n-alkaanit, joiden  $C_n$  on 24–36 (Penzés 2005). Muita organogeeleissä tyypillisesti käytettyjä pienimolekyylipainoisia organogelaattoreja ovat lesitiini, kolloidaalinen piidioksidi, eräät metalliyhdisteet, sorbitaanimonostearaatti ja muut sorbitaanijohdokset sekä jotkin yksinkertaiset aminohapot ja steroidit sekä niiden erilaiset johdannaiset kuten ALS-yhdisteet (*aromatic group linked to steroidal moiety*) (Terech ja Weiss 1997; Vintiloiu ja Leroux 2008; Balasubramanian ym. 2012; Sagiri ym. 2014). Pienimolekyylipainoisista organogelaattoreista sorbitaanimonostearaatin ja lesitiinin tiedetään muodostavan geeleissä nestemäisiä säieverkostoja, kun taas pienimolekyylipainoisten n-alkaanien ja ALS-yhdisteiden on organogeeleissä havaittu muodostavan kiinteitä säieverkostoja (Vintiloiu ja Leroux 2008).

Kiinteistä säikeistä muodostuvien organogeelien valmistus aloitetaan tavallisesti lisäämällä geelinmuodostajana käytetty yhdiste lämmitettyyn orgaaniseen geelipohjaan (Vintiloiu ja Leroux 2008). Organogelaattorien lisäysten jälkeen seosten lämpötila tiputetaan gelaattorien liukoisuuksien perusteella riittävän alhaiseksi, jolloin gelaattorimolekyylien nopea osittainen sakkautuminen ja gelaattorimolekyylien ja liuotinmolekyylien välinen pienentynyt affiniteetti saavat lämpötilan laskun seurauksena aikaan gelaattorimolekyylien välisten aggregaattien muodostumista. Muodostuvat aggregaatit pysyvät yhdessä intermolekulaaristen fysikaalisten vuorovaikutusten avulla. Vaikka gelaattorimolekyylien ja liuotinmolekyylien välinen affiniteetti pieneneekin jäähtymisen seurauksena voimakkaasti, on liuotinmolekyylien ja gelaattorimolekyyliaggregaattien välillä käytännössä aina kuitenkin jäljellä vähäistä affiniteettia, mikä stabiloi systeemiä ja estää faasien täydellistä erottumista.

Kiinteistä säikeistä muodostuvista organogeeleistä poiketen, nestemäisistä säikeistä muodostuvat, pääasiassa pinta-aktiivisia organogelaattoreja sisältävät, organogeelit valmistetaan tavallisesti huoneenlämpötilassa lisäämällä orgaanisten liuottimien ja organogelaattorien seoksiin pieniä määriä polaarisia liuottimia (Vintiloiu ja Leroux 2008). Polaaristen liuottimien lisäys pinta-aktiivisia aineita sisältäviin orgaanisiin

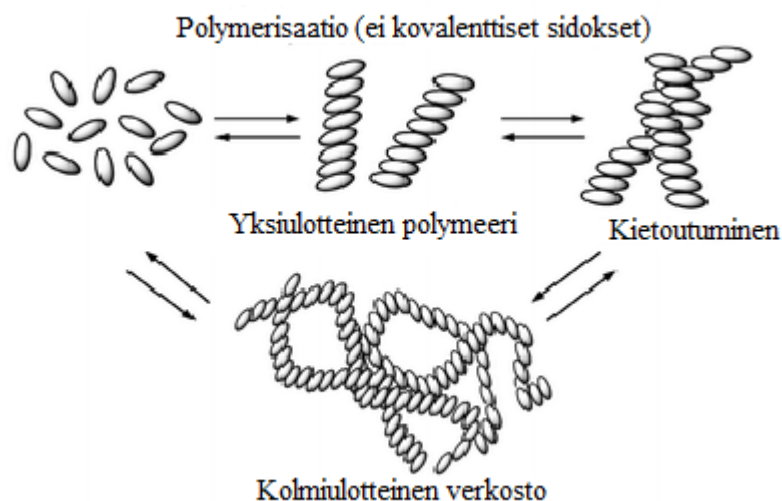


liuottimiin saa pinta-aktiivisten aineiden uudelleenjärjestäytymisen seurauksena aikaan orgaanisten liuottimien immobilisoitumista. Uusimpien tutkimusten mukaan nestemäisten säieverkostojen lisäksi myös kiinteistä säieverkostoista muodostuvia organogeelejä on mahdollista valmistaa ilman lämpöä muun muassa ultrasonikaation ja *in situ* organogelaation avulla (George ja Weiss 2002; Suzuki ym. 2004; Bardelang ym. 2008). Isosyanaattien ja alkyylimiamiinien avulla orgaanisissa liuottimissa ilman lämpöä muodostuneiden *in situ* organogeelien on ominaisuuksiltaan ja ulkomuodoltaan havaittu vastaavan lämmön avulla valmistettuja, kiinteistä säieverkostoista muodostuneita, organogeelejä (Suzuki ym. 2004).

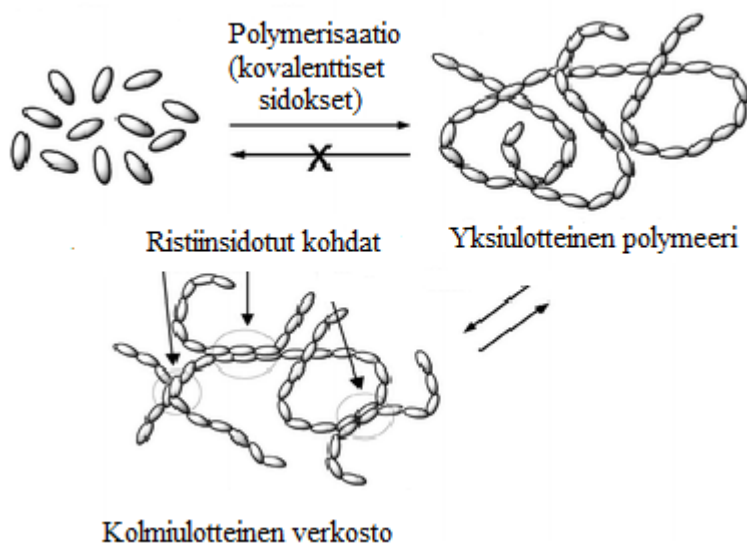
### 3.1.2 Polymeeriset organogelaattorit

Toinen organogeelien geelinmuodostajien pääryhmä koostuu polymeerisistä organogelaattoreista (Balasubramanian ym. 2012). Polymeeriset organogelaattorit immobilisoivat orgaanisia liuottimia muodostamalla geeleille tyypillisiä verkkomaisia rakenteita joko kovalenttisesti ristiinsidottujen tai toisiinsa kietoutuneiden polymeeriketjujen välityksellä (Vintiloiu ja Leroux 2008). Ristiinsidotuissa ketjuissa gelaattoripolymeerien välille muodostuu kemiallisia vuorovaikutuksia, minkä vuoksi tällaisista geeleistä käytetään tyypillisesti nimitystä kemiallinen geeli ja gelaattoripolymeereistä nimitystä konventionaalinen polymeeri (Kuva 1). Toisiinsa kietoutuneet gelaattorimolekyyliketjut muodostavat puolestaan fysikaalisia geelejä, joita on kietoutumisten lisäksi mahdollista stabiloida myös heikoilla ketjujen välisillä vuorovaikutuksilla kuten vetysidoksilla, van der Waalsin vuorovaikutuksilla tai elektrostaattisilla vuorovaikutuksilla (Vintiloiu ja Leroux 2008). Fysikaalisia geelejä muodostavista organogelaattoripolymeereistä voidaan kemiallisten geelien konventionaalisista polymeereistä poiketen käyttää nimitystä supramolekulaarinen polymeeri. Konventionaalisista polymeereistä muodostuvien kemiallisten geelien on kovalenttisten sidosten vuoksi havaittu fysikaalisista geeleistä poiketen olevan polymerisaationsa suhteen palautumattomia (Kuva 1).

### Supramolekulaarinen polymeeri



### Konventionaalinen polymeeri



Kuva 1. Supramolekulaarisia tai konventionaalisia polymeerejä sisältävien organogeelien kolmiulotteisten verkostojen muodostuminen (muokattu Suzuki ja Hanabusa 2010).

Polymeerisiä organogelaattoreja sisältäviin organogeeleihin on viime vuosina kiinnitetty yhä enenevästi huomiota johtuen polymeeristen organogeelien potentiaalisesta käytöstä erilaisissa sovelluskohteissa (Naito ym. 2009). Mahdollisia sovelluskohteita on iskunvaimentimien ja erilaisten haihtuvien orgaanisten kierrätysmateriaalien lisäksi arveltu löytyvän myös lääkeaineiden kuljetuksen parista. Polymeerisiä organogelaattoreja sisältävien geelien on havaittu muodostavan nesteitä matalammissa

lämpötiloissa kuin pienimolekyyllipainoisia organogelaattoreja sisältävien geelien (Naito ym. 2009; Suzuki ja Hanabusa 2010). Polymeerisiä organogelaattoreja sisältävien geelien on lisäksi havaittu olevan ominaisuuksiltaan pienimolekyyllipainoisia organogelaattoreja sisältäviä organogeelejä suhteellisesti vahvempia, stabiilimpia ja hitaammin sedimentoituvia.

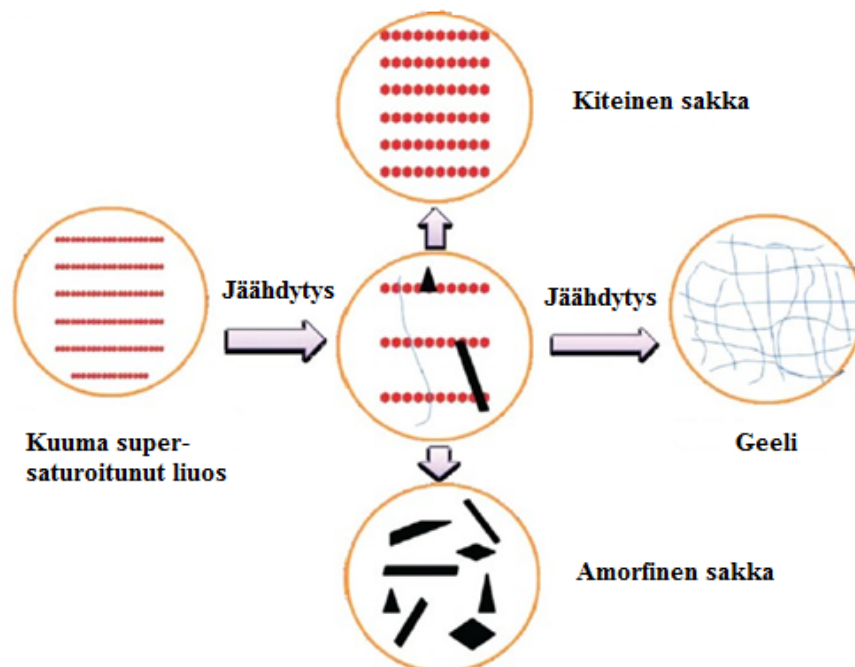
Yksi eniten käytetyistä polymeerisistä organogelaattoreista on etyyliselluloosa (Co ja Marangoni 2012). Etyyliselluloosaa on organogeeleissä käytetty organogelaattorina yhdessä pinta-aktiivisten aineiden kanssa, sillä pinta-aktiivisten aineiden on yleisesti ottaen havaittu parantavan etyyliselluloosan dissoluutiota. Geelitymisen kannalta pinta-aktiivisten aineiden ei etyyliselluloosan tapauksissa ole havaittu olevan välttämättömiä (Dey ym. 2011). Hydrofiilisten päiden ryhmien kokojensa perusteella pinta-aktiivisilla aineilla on kuitenkin joidenkin havaintojen mukaan arvioitu olevan vaikutusta organogeelien viskoelastisissa ominaisuuksissa. Etyyliselluloosan heikkoutena organogeelien valmistuksen kannalta pidetään sen liuottamisessa tarvittavia korkeita, jopa 125–150 °C, lämpötiloja (Co ja Marangoni 2012; Gravelle ym. 2012). Etyyliselluloosan lisäksi muita organogeeleissä yleisesti käytettyjä polymeerisiä organogelaattoreita ovat muun muassa polyetyleni, etyleenimetakrylaatti sekä eräät metakrylaattihapon kopolymeerit (Sagiri ym. 2014).

### 3.2 Organogeelien rakenne ja muodostuminen

Organogeelien rakenne voidaan pääsääntöisesti jakaa kolmeen osaan; primääriseen, sekundääriseen ja tertiääriseen rakenteeseen (Balasubramanian ym. 2012). Organogeelien primäärirakenne koostuu geelinmuodostajina toimivien yksittäisten organogelaattorimolekyylien yhteenliittymistä eli aggregaateista. Geelien sekundäärirakenteella tarkoitetaan puolestaan primääriaggregaattien muodostamia sekundäärisiä rakenteita kuten erilaisia misellejä, vesikkeleitä, säikeitä tai levyjä. Geelien tertiäärirakenne kuvaa vastaavasti näin muodostuneiden sekundääristen aggregaattirakenteiden välisiä interaktioita. Sekundääristen aggregaattirakenteiden välisten vuorovaikutusten seurauksena geeleille muodostuu lopulta niille tyypillinen

kolmiulotteinen verkkorakenne, joka immobilisoi geelipohjana toimivan orgaanisen liuottimen ja saa aikaan organogeelien muodostumisen.

Kuten edellä luvussa 3.1.1 on kuvattu, voidaan pienimolekyyllipainoisista organogelaattoreista muodostuvat organogeelit jakaa kiinteistä ja nestemäisistä säieverkostoista muodostuviin organogeeleihin (Balasubramanian ym. 2012). Kiinteistä säieverkostoista muodostuvat organogeelit valmistetaan tavallisesti lämmön avulla. Lämmitystä seuraavan jäähdytysvaiheen aikana kolme erilaista prosessia ovat mahdollisia (Kuva 2). Mikäli organogelaattorimolekyylien muodostamat kiinteät säikeet aggregoituvat jäähdytysvaiheen aikana täysin järjestäytyneesti, muodostuu seoksesta kiteinen, sakkautunut liuos. Mikäli organogelaattorimolekyylien säikeiden välinen järjestäytyminen tapahtuu puolestaan täysin satunnaisesti, saavat aggregoituneet säikeet aikaiseksi amorfisen sakan. Varsinaisten organogeelien on havaittu muodostuvan tilanteissa, joissa organogelaattorimolekyylien säikeiden välinen aggregaatio tapahtuu näiden kahden prosessin välimuotona (Kuva 2). Nestemäisiä säieverkostoja sisältävien organogeelien muodostumista on tässä työssä tarkasteltu luvussa 5.2.2.



Kuva 2. Kiinteitä säikeitä muodostavien pienimolekyyllipainoisten organogelaattorien valmistusprosessiin kuuluvan jäähdytysvaiheen vaikutus organogeelien muodostumiselle (muokattu Balasubramanian ym. 2012).

### 3.3 Organogeelien fysikaaliskemialliset ominaisuudet

Organogelaattorimolekyylien muodostaman kolmiulotteisen verkoston on havaittu vaikuttavan organogeelien fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin keskeisesti (Terech ja Weiss 1997; Jadhav ym. 2012). Organogeelien kolmiulotteisten verkostojen luonteisiin vaikuttavat paitsi gelaattorimolekyylien välisten sidosten ja kietoutumisten muodostuminen, myös gelaattorimolekyylien ja orgaanisten liuotinmolekyylien välinen affiniteetti (Zhu ja Dordick 2006). Orgaanisten liuottimien ja gelaattorimolekyylien lisäksi myös geelien valmistusprosesseilla on havaittu olevan vaikutusta organogeelien fysikaaliskemiallisten ominaisuuksien muodostumisessa (Sagiri ym. 2014). Tässä kappaleessa on tarkasteltu muutamia organogeelien fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia lyhyesti.

#### 3.3.1 Viskoelastisuus

Viskositeetilla tarkoitetaan aineen kykyä vastustaa nesteiden virtausta ja elastisuudella puolestaan kiinteiden kappaleiden kykyä vastustaa muodonmuutosta (Aulton 2007). Kun elastisesti käyttäytyvään materiaaliin kohdistetaan vakiojännitys, tapahtuu materiaalissa muodonmuutos, joka syntyy ja poistuu jännityksen muutosten seurauksena välittömästi. Kun vakiojännitys puolestaan kohdistetaan viskoosisti käyttäytyvään materiaaliin, kasvaa muodonmuutos niin pitkään, kunnes jännitys poistetaan. Jännityksen poistamisen jälkeenkin viskoosisti käyttäytyvään materiaaliin jää kuitenkin elastisesta materiaalista poiketen jäljelle palautumaton muodonmuutos. Viskoelastisilla materiaaleilla tarkoitetaan materiaaleja, joilla on piirteitä sekä viskoosisti että elastisesti käyttäytyviltä materiaaleilta.

Organogeelien on viskoelastisuutensa suhteen havaittu noudattavan Maxwellin materiaalmallia (Shchipunov 2001). Maxwellin materiaalmalli on matemaattinen malli, joka kuvaa materiaaliin kohdistuvan vakiojännityksen laukeamista asteittain (Aulton 2007). Malli ennustaa viskoelastiseen materiaaliin kohdistuvan jännityksen pienenevän ajan suhteen eksponentiaalisesti. Materiaaliin kohdistuvalla vakiojännityksellä on Maxwellin mallin mukaisesti aina kaksi komponenttia; elastinen

komponentti, joka laukeaa välittömästi vapauttaakseen siihen kohdistuvan jännityksen, sekä viskoosi komponentti, joka puolestaan kasvaa niin pitkään, kun materiaaliin kohdistuu jännitystä.

Leikkausjännityksen ollessa matala, käyttäytyvät organogeelit kolmiulotteisen verkkomaisen rakenteensa vuoksi tyypillisesti kiinteiden aineiden tavoin ja näyttäytyvät näin ollen ulospäin elastisina (Sahoo ym. 2011). Leikkausjännityksen kasvaessa alkavat säikeiden väliset fysikaaliset vuorovaikutuskohdat kuitenkin heikentyä, ja lopulta leikkausjännityksen saavuttaessa riittävän suuren arvon, muuttuvat organogeelit kiinteiden aineiden tavoin käyttäytyvistä materiaaleista valuviksi. Tätä organogeelien käyttäytymistä voidaan parhaiten selittää plastisella valumiskäyttäytymisellä.

### 3.3.2 Kahtaistaitteisuus

Kahtaistaitteisuudeksi kutsutaan ilmiötä, jossa valonsäde jakautuu kahdeksi lineaarisesti polarisoituneeksi säteeksi kohdatessaan väliaineen (Polymeerimateriaalien perusteet 2010). Kohtisuoraan väliaineen optista akselia vastaan kulkevaa sädettä kutsutaan yleissääntöiseksi säteeksi ja väliaineessa vinosti optiseen akseliin nähden kulkevaa sädettä erikoissääntöiseksi säteeksi. Yleissääntöinen säde noudattaa taittumis- ja heijastumislakeja, mutta erikoissääntöinen säde taittuu poikkeavasti.

Organogeelien on polarisoidussa valossa havaittu näyttäytyvän tummina matrikseina (Sahoo ym. 2011). Koska polarisoitu valo ei organogeelien isotrooppisen luonteen vuoksi kykene läpäisemään organogeelien tummaa matriksia, ei organogeeleillä ole havaittu olevan kahtaistaittavia ominaisuuksia.

### 3.3.3 Lämpöpalautuvuus

Kun polymeerisiä tai kiinteistä säikeistä muodostuvia pienimolekyylipainoisia organogelaattoreita sisältäviä organogeellejä lämmitetään yli niiden kriittisen lämpötilan, menettävät organogeelit kiinteän matriksimaisen rakenteensa ja muuttuvat valuviksi (Sahoo ym. 2011). Tämä johtuu termisen energian aikaansaamasta

organogelaattorimolekyylien välisten fysikaalisten vuorovaikutusten häiriintymisestä. Kun lämmitetyt organogeelisysteemit tämän jälkeen jäähdytetään, muodostuvat fysikaaliset vuorovaikutukset organogelaattorimolekyylien välille uudelleen, minkä vuoksi organogeelien voidaan sanoa olevan ominaisuuksiltaan lämpöpalautuvia. Lämpöpalautuvien ominaisuuksiensa vuoksi organogeelejä on mahdollista käyttää matrikseina erilaisten kiinteiden nano- ja mikroluokan rakenteiden sekä esimerkiksi erilaisten pigmenttien ja kosmetiikkatuotteiden tuotannossa (Abdallah ja Weiss 2000). Kiinteiden rakenteiden tuottaminen on mahdollista, koska lämpöpalautuvien ominaisuuksiensa vuoksi geelimatriksit on mahdollista poistaa systeemeistä lämpötilaa kohottamalla. Kiinteiden rakenteiden poistamisen jälkeen geelit on lämpötilaa tiputtamalla mahdollista taas palauttaa takaisin alkuperäiseen muotoonsa.

### 3.3.4 Termostabiilisuus

Organogeelien on lämpöpalautuvuuden lisäksi havaittu olevan ominaisuuksiltaan myös termostabiileja (Sahoo ym. 2011). Organogeelien termostabiilisuus johtuu gelaattorimolekyylien kyvystä muodostaa organogeeleille tyypillisiä verkkomaisia säierakenteita spontaanisti, jolloin organogeelien matalaenerginen termostabiili tila muodostuu systeemin kokonaisvapaaenergian pienentyessä. Organogeelien termostabiilisuutta on pyritty hyödyntämään muun muassa hitaasti lääkeainetta vapauttavien systeemien kehityksessä. Termostabiilisuuden lisäksi myös organogeelien kosteusherkkyyttä on käytetty hyväksi kontrolloitujen lääkemuotojen kehityksessä (Wright ja Marangoni 2006).

### 3.3.5 Optinen kirkkaus

Organogeelit voivat koostumuksestaan riippuen olla ulkomuodoltaan joko läpinäkyviä tai läpinäkymättömiä (Sahoo ym. 2011). Kolloidaalista piidioksidia sisältävät organogeelit ovat läpinäkyviä tilanteissa, joissa geelipohjan refraktiivinen indeksi vastaa kolloidaalisen piidioksidin refraktiivista indeksiä (1,46) (Hapgood 2009a). Koska kalaöljyjen refraktiivisen indeksin on arvioitu olevan noin 1,479, ovat työssä valmistetut organogeelit ulkomuodoltaan läpinäkyviä (Keck 2006).

### 3.3.6 Kiraalisuus

Pienimolekyylipainoisten organogelaattorien kiraalisuuden on havaittu vaikuttavan, paitsi kiinteiden säieverkostojen muodostumiseen ja stabiiliuteen, myös organogeelien lämpöpalautuvuuteen (Sahoo ym. 2011). Kiraliakeskus organogelaattoreissa helpottaa molekyylien kompaktia pakkautumista stabiloiden organogeelisysteemejä termodynaamisesti ja kineettisesti. Kiraalisuuden on arvioitu olevan toivottava ominaisuus kiinteitä säikeitä muodostavilla organogelaattoreilla, mutta nestemäisiä säikeitä muodostavien organogelaattorien kohdalla kiraalisuuden vaikutus on kuitenkin käytännössä arvioitu merkityksettömäksi.

### 3.3.7 Bioyhteensopivuus

Organogeelien kehityksen alkuvaiheessa tutkimuksissa käytettiin pääsääntöisesti ei-bioyhteensopivia organogelaattoreita, minkä vuoksi organogeelien ajateltiin pitkään olevan ominaisuuksiltaan ei-bioyhteensopivia (Sahoo ym. 2011). Bioyhteensopivien materiaalien mukaan tuominen organogeelien kehitykseen on kuitenkin avannut uusia mahdollisuuksia käyttää organogeelieitä myös erilaisissa biolääketieteellisissä sovelluksissa.

## 3.4 Organogeelien ja organogelaattorien analysointi

Organogeelleille ja organogelaattoreille suoritetaan usein erilaisia analyyskejä joko organogeelien kehityksen tai lopputuotteiden analysoinnin yhteydessä. Tyypillisimpiä kehityksen aikaisia analyyskejä ovat muun muassa kriittisen geelinmuodostajan konsentraation ja kriittisen muodostumislämpötilan sekä geelien fysikaalisen stabiilisuuden määrittäminen. Lopputuoteanalyysillä voidaan puolestaan arvioida esimerkiksi geelien organoleptisiä ja reologisia ominaisuuksia tai lääkeaineiden vapautumista valmisteista *in vitro*. Useimmat analyysit suoritetaan geeleille noin viikon kuluttua geelien valmistuksesta niiden riittävän ja tasaisen geeliytymisen varmistamiseksi (Nippe ja General 2014).



### 3.4.1 Kriittinen geelinmuodostajan konsentraatio

Organogelaattorien kriittinen konsentraatio on mahdollista määrittää menetelmällä, jossa tunnettu määrä organogelaattoria lisätään säiliöön, jossa on tunnettu määrä orgaanista liuotinta (Balasubramanian ym. 2012). Säiliö suljetaan huolellisesti ja sitä lämmitetään varovasti niin, että säiliön sisällä oleva massa sulaa täydellisesti. Lämmittämisen jälkeen säiliön annetaan jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen säiliön ylösalaisin kääntämistä ja riittävän geelinmuodostajan konsentraation tarkastelemista. Mikäli säiliön sisällä oleva massa ei valu, on organogelaattorien määrä geelien muodostamisen kannalta riittävän suuri. Tutkimalla geelien muodostumista ja valuvuutta erilaisilla organogelaattorikonsentraatioilla, on organogelaattoreille mahdollista määrittää pienin mahdollinen konsentraatio, eli niin kutsuttu kriittinen konsentraatio, jolla organogeelien on vielä havaittu muodostuvan. Kriittistä geelinmuodostajan konsentraatiota voidaan tämän jälkeen käyttää hyväksi optimaalista geeliformulaatiota suunniteltaessa. Lämmittämisen lisäksi ylösalaisin käännetyn säiliön menetelmää voidaan käyttää myös geelinmuodostajille, jotka eivät vaadi lämmittämistä.

### 3.4.2 Kriittinen muodostumislämpötila

Kriittisen geelinmuodostajan konsentraation lisäksi kiinteitä säikeitä muodostaville organogeeleille pyritään tyypillisesti määrittämään myös niin kutsuttu kriittinen muodostumislämpötila, eli lämpötila, jonka alapuolella geeli ei enää muodosta selkeästi havaittavissa olevaa virtausta (Balasubramanian ym. 2012). Kun geelin lämpötila nousee kriittisen lämpötilan (*sol-to-gel phase transition temperature*) yläpuolelle, menettää geeli kolmiulotteisen rakenteensa ja muuttuu valuvaksi. Kriittinen muodostumislämpötila on mahdollista määrittää ainakin kolmella erilaisella menetelmällä: lasipallomenetelmällä, kuplamenetelmällä sekä menetelmällä, jossa hyödynnetään edellä esitettyä ylösalaisin käännetyn säiliön menetelmää (Stein ja Buggisch 2000; Díaz ym. 2008).

Lasipallomenetelmässä näytesäiliöön asetetaan geelinäytteen pinnalle lasipallo, jonka liikkeitä näytesäiliössä seurataan lämmittämisen aikana silmämääräisesti (Díaz ym.

2008). Kriittinen muodostumislämpötila katsotaan menetelmässä saavutetuksi lämpötilassa, jossa lasipallo putoaa näytesäiliön pohjalle. Kuplamenetelmässä tutkittava geeli suljetaan erilliseen kammioon, johon on liitetty kiinni membraanilla eristetty, vedellä täytetty painekammio (Stein ja Buggisch 2000). Tutkittavaa geeliä täynnä olevaan kammioon asetetaan ruiskun avulla ilmakupla, jonka liikkeitä kammiossa seurataan kameran avulla tutkittavaa näytesäiliötä tasaisesti lämmittäen. Mitä nopeammin kupla nousee geelinäytteen pinnalle, sitä valuvammasta ja nestemäisemmästä geelinäytteestä on tavallisesti kyse (Raghavan ja Cipriano 2006). Lämpötilan muutoksia ja kuplan liikkeitä seuraamalla on organogelaattoreille näin ollen mahdollista määrittää korkein mahdollinen lämpötila, kriittinen muodostumislämpötila, jolloin kuplan ei käytännössä vielä havaita liikkuvan geelissä. Edellä mainittujen menetelmien lisäksi myös erottelevaa pyyhkäisykalorimetria (*differential scanning calorimetry*, DSC), kuumalevymikroskooppia (*hot stage microscope*, HSM) sekä reologisia mittauksia on viime vuosina käytetty kriittisen muodostumislämpötilan määrittämisessä (Murdan ym. 2005). Kriittinen muodostumislämpötila määritetään tyypillisesti tilanteissa, joissa geelien valmistuksessa käytetään lämmitystä vaativia pienimolekyylipainoisia tai polymeerisiä organogelaattoreita. Koska tässä työssä organogeelit on valmistettu ilman lämpöä, ei kriittisen muodostumislämpötilan määrittäminen ole tämän työn kannalta kuitenkaan relevanttia.

### 3.4.3 Fysikaalinen stabiilisuus

Lääkevalmisteiden riittävä fysikaalinen stabiilisuus on usein ehdoton edellytys lääkekehityksen jatkamiselle. Organogeelien fysikaalista stabiilisuutta voidaan arvioida pitkäkestoisilla säilyvyystutkimuksilla, joissa näytteitä säilytetään vakio-olosuhteissa, joko 25 °C /60 % RH tai 40 °C/75 % RH, kuuden kuukauden ajan ottaen geelinäytteistä osanäytteitä ajanhetkinä 0, 3 ja 6 kk (Daman Huri ym. 2013). Pitkäkestoisten säilyvyystutkimusten lisäksi näytteille voidaan suorittaa myös niin kutsuttuja lyhytkestoisia säilyvyystutkimuksia kiihdytetyissä olosuhteissa, jolloin valmisteiden pitkäaikaisesta fysikaalisesta stabiilisuudesta on mahdollista saada viitteitä pitkäkestoisia säilyvyystutkimuksia lyhyemmässä ajassa. Lyhytaikaisissa, kiihdytetyissä olosuhteissa suoritetuissa säilyvyystutkimuksissa näytteet voidaan altistaa joko

korkeammille lämpötiloille ja/tai korkeammille suhteellisille kosteuksille tai ne voidaan toisaalta altistaa esimerkiksi mekaaniselle rasitukselle kuten sentrifugoinnille. Hitaan sentrifugoinnin seurauksena organogelaattorimolekyylien muodostama kolmiulotteinen verkosto alkaa hiljalleen hajota. Verkoston hajoamisen seurauksena geelien sisäinen öljyfaasi erottuu organogeelien pinnalle omaksi kerrokseksi kiinteän verkoston supistuttua öljyfaasin alta. Liian voimakkaissa olosuhteissa suoritettu sentrifugointi saattaa olla geelien rakenteen kannalta kohtalokasta, minkä vuoksi sentrifugoinnissa pyritään tyypillisesti suosimaan suhteellisen matalia sentrifugointinopeuksia. Pasquali (2010) ja Daman Huri (2013) tutkimusryhmineen käyttivät sentrifugointimenetelmää analysoidessaan lipogeelien fysikaalista stabiilisuutta. Sentrifugointinopeutena tutkimuksissa käytettiin 2500 rpm nopeutta ja sentrifugointiaikana 30 minuuttia. Geelien pitkäaikaista fysikaalista stabiilisuutta voidaan mekaanisen ärsytyksen ja korkeiden lämpötilojen lisäksi arvioida myös altistamalla näytteitä voimakkailla lämpötilojen vaihteluille (Goupale ja Rajkapoor 2011). Näytteiden pitkäaikaisesta fysikaalisesta stabiilisuudesta on usein mahdollista saada viitteitä jo 7 vuorokauden kuluttua testauksen aloittamisesta, kun näytteet altistetaan ensin 4 °C ja sitten 40 °C lämpötiloille aina 24 tuntia kerrallaan.

#### 3.4.4 Muut analyysit

Kriittisen geelinmuodostajan konsentraation, kriittisen muodostumislämpötilan ja säilytyksen aikaisen fysikaalisen stabiilisuuden lisäksi organogeeliformulaatioille voidaan geelien laadun ja ominaisuuksien karakterisoimiseksi suorittaa myös muita analyysejä. Tyypillisimmin analyyseillä tarkastellaan esimerkiksi organogeelien organoleptisiä tai reologisia ominaisuuksia, mikroskooppista rakennetta, koostumusta, lääkeaineiden yhdenmukaista jakautumista tai lääkeaineiden vapautumista valmisteista *in vitro* (Daman Huri ym. 2013).

Organogeeliformulaatioiden mikroskooppista rakennetta voidaan tarkastella joko tavallisella kirkkaan kentän valomikroskoopilla tai polarisoidulla mikroskoopilla tyypillisimmin noin 40-kertaisella suurennoksella (Wright ja Marangoni 2011; Daman Huri ym. 2013). Polarisoidun mikroskoopin avulla on mahdollista havaita sekä

geeleissä esiintyviä kiderakenteita että geelien mikrorakenteiden järjestäytymistä. Organogeelejä on havaittu olevan mahdollista jäädyttää myös läpäisyelektronimikroskoopilla (*cryogenic transmission electron microscopy*, Cryo-TEM) tai pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (*cryogenic scanning electron microscopy*, Cryo-SEM) suoritettavaa tarkempaa tarkastelua varten (Jung ym. 2000; Rogers ym. 2007). Mikroskooppien lisäksi geelien rakenteiden tarkastelussa on mahdollista käyttää myös röntgendiffraktometriaa (*X-ray diffraction*, XRD) (Wright ja Marangoni 2006).

Geelien reologisia ominaisuuksia voidaan puolestaan tarkastella reometrisillä mittauksilla, joiden avulla geelien viskositeetti ja viskoelastiset ominaisuudet on mahdollista määrittää noin viikon kuluttua geelien valmistuksesta (Daman Huri ym. 2013). Oskillointitilassa tapahtuvassa mittauksessa reometri mittaa näytteiden muodonmuutoksen ja voiman sekä näiden parametrien välisen vaihe-eron (Simonen 2011). Jännityksen ja sen aiheuttaman deformaation aikariippuvuus on seurausta materiaalien viskoelastisista ominaisuuksista. Täysin viskooseilla materiaaleilla maksimijännityksen ja muodonmuutoksen välisen vaihe-eron on havaittu olevan 90°, kun taas vastaavasti täysin elastisilla materiaaleilla deformaatio seuraa näytteeseen kohdistuvaa jännitystä samanaikaisesti vaihe-eron ollessa 0°. Viskoelastisten materiaalien, joita myös organogeeleit ovat, vaihe-ero on näiden ääripäiden välissä ja kuvaa siis materiaalien elastisuutta suhteessa niiden viskoosisuuteen; mitä pienempiä reometrillä mitatut viskoelastisten materiaalien maksimijännitysten ja muodonmuutosten väliset vaihe-erot ovat, sitä elastisemmista näytteistä on pääsääntöisesti kyse. Pelkkään vaihe-eroon perustuvan arvioinnin lisäksi oskillointimittausten tulosten perusteella näytteille on mahdollista määrittää myös niin kutsuttu kompleksinen leikkausmoduuli  $G^*$ . Kompleksinen leikkausmoduuli  $G^*$  voidaan jakaa kahteen osaan: varastomoduliin  $G'$ , joka kuvaa geelien elastisia ominaisuuksia sekä häviömoduliin  $G''$ , joka puolestaan kuvastaa geelien viskoosia osuutta. Häviötangentin ( $\tan\delta$ ) avulla varasto- ja häviömoduulien arvojen perusteella on vastaavasti mahdollista kuvata näytteiden viskoosisten ja elastisten ominaisuuksien välistä suhdetta (Korhonen 2003). Häviötangentin arvon ollessa 1, ovat näytteiden viskoosiset ja elastiset ominaisuudet yhtä voimakkaita. Mitä pienempi saatu

häviötangentin arvo kuitenkin on, sitä elastisempi myös näyte reologisten mittausten perusteella on.

Oskillointimittausten lisäksi sellaisille geeleille, joilla oskillointimittausten tulosten perusteella on havaittu olevan lineaarinen viskoelastinen alue, voidaan suorittaa myös niin kutsuttu *creep recovery*-testi (Yrjänäinen 2002). *Creep recovery*-testi mittaa jännityksen aiheuttamaa venymää ja laskee sen perusteella komplianssin, eli venymän ja käytetyn jännityksen välisen suhteen. Komplianssin avulla erilaisten formulaatioiden elastisten ja viskoosisten ominaisuuksien suuruusastetta sekä suhdetta on mahdollista vertailla luotettavasti.

Organogeelien sisäisen rakenteen ymmärtäminen sekä reologisissa mittauksissa havaitut muutokset geelien viskoelastisissa ominaisuuksissa antavat arvokasta tietoa geelien stabiilisuuden ja käyttömahdollisuuksien kannalta. Mikroskooppisen rakenteen ja reologisten ominaisuuksien lisäksi organogeeleille on mahdollista suorittaa analyysyjä myös lääkeaineiden tasaisen jakautumisen varmistamiseksi. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi dispergoimalla pieni, tarkasti mitattu, määrä organogeeliä sopivaan orgaaniseen liuottimeen ja analysoimalla vaikuttavan lääkeaineen määrä näytteestä suodatuksen ja kaasujen poiston jälkeen HPLC-menetelmällä (Bastiat ym. 2010; Daman Huri ym. 2013). Tasainen ja valmistusohjeen mukainen lääkeainepitoisuus näytteissä kuvastaa lääkeaineiden homogeenista jakautumista valmisteissa. Asianmukaista ja tasaista lääkeainepitoisuutta käytetään usein toimivan valmistusprosessin surrogaattina, mutta sen avulla on valmistusprosessin lisäksi mahdollista arvioida myös lääkeaineiden kemiallista stabiilisuutta. Pitoisuuden lisäksi organogeelivalmisteista tutkitaan usein myös lääkeaineiden vapautumista, sillä geelinmuodostajien määrällä on joidenkin tutkimusten mukaan havaittu olevan vaikutusta lääkeaineiden vapautumisnopeudessa. Lääkeaineiden vapautuminen valmisteista hidastuu tyypillisesti geelinmuodostajan konsentraation lisääntyessä, todennäköisesti valmisteiden viskositeetteihin liittyvien muutosten seurauksena.

### 3.5 Geelit farmaseuttisina valmisteina

Hydrogeelejä on farmaseuttisessa tuotekehityksessä käytetty jo pitkään geeli- ja voidepohjien lisäksi muun muassa suspensioiden ja emulsioiden viskositeettia kohottavina aineina sekä tablettien sideaineina, hajotusaineina, päällystysaineina ja lääkeaineiden liukenemista hidastavina aineina (Peppas ym. 2000). Hydrogeeleistä poiketen orgaanisia liuottimia sisältävien organogeelien käyttö on farmaseutisissa sovelluksissa kuitenkin tähän päivään asti ollut melko harvinaista, johtuen organogelaattorien toksisuuteen, stabiilisuuteen ja bioyhteensopivuuteen liittyvien tietojen rajallisuudesta (Vintilou ja Leroux 2008). Tutkimus ja kiinnostus organogeelejä kohtaan on viime vuosikymmeninä lisääntynyt jatkuvasti. Muihin lipidipohjaisiin kantajasysteemeihin verrattuna organogeelien on ainakin tehon, käyttökelpoisuuden ja säilyvyyden suhteen havaittu olevan muita kantajasysteemejä toivotumpia (Jadhav ym. 2012).

Organogeelejä on farmaseuttisessa tuotekehityksessä yritetty erilaisten antoreittien kautta hyödyntää niin lääkeaineiden kuin rokotteidenkin formuloinnissa (Vintilou ja Leroux 2008). Tyypillisimmin käytettyjä antoreittejä ovat dermaaliset ja transdermaaliset antoreitit, sillä eräiden organogeelien komponenttien on näillä antoreiteillä havaittu toimivan geelipohjien lisäksi myös permeaation edistäjinä. Dermaalisten ja transdermaalisten antoreittien lisäksi muina mahdollisina vaihtoehtoina on pidetty parenteraalista depot-annostelua, oraalista annostelua sekä limakalvojen läpi tapahtuvaa joko bukkalista, nasaalista tai rektaalista annostelua.

#### 3.5.1 Organogeelit oraalisina valmisteina

Organogeelien on etenkin lipofiilisten lääkeaineiden kohdalla arveltu toimivan hyvinä, säädellysti lääkeainetta vapauttavina matrikseina oraalisisissa formulaatioissa (Iwanaga ym. 2010). Ibuprofeenin vapautumisen on organogeeliformulaatioissa havaittu hidastuvan pienentyneen diffuusionopeuden seurauksena. Tämän perusteella ibuprofeenin onkin organogeelipohjaisista suspensioista havaittu sekä imeytyvän hitaammin että säilyttävän plasmapitoisuutensa pidempään kuin vastaavanlaisten

vesipohjaisten ibuprofeeniformulaatioiden tapauksista. Lipofiilisten lääkeaineiden lisäksi myös hydrofiilisiä lääkeaineita, kuten teofylliiniä tai ofloksasiinia, on onnistuneesti formuloitu kontrolloidusti lääkeainetta vapauttaviin oraalisiin valmisteisiin (Iwanaga ym. 2012).

Säädellysti lääkeainetta vapauttavien systeemien lisäksi organogeeljä on oraalisessa käytössä tutkittu vasta vähänlaisesti. Murdan (2005) tutkimusryhmineen havaitsivat siklosporiini A:n imeytyvän koviin gelatiinikapseleihin suljetuista, sorbitaani-monostearaattia sisältävistä organogeeliformulaatioista huomattavasti hydrofiilisiä amfifilogeelikapseliformulaatioita nopeammin. Kapseleihin pakattujen organogeeliformulaatioiden imeytymisnopeuksien havaittiin olevan samalla tasolla kaupallisesti saatavilla oleviin mikroemulsiopohjaisiin Neoral® -kapseleihin verrattuna. Mikroemulsiopohjaisiin kapseleihin verrattuna organogeelipohjaisten kapseleiden valmistusprosessien on kuitenkin arvioitu olevan huomattavasti yksinkertaisempia.

### 3.5.2 Organogeelit eläinlääkinnässä

Suurin osa nykyisistä suun kautta annosteltavista eläinlääkevalmisteista on joko nestemäisiä tai puolikiinteitä, koska kiinteiden lääkemuotojen annostelu eläimille on käytännössä osoittautunut haasteelliseksi (Tiwari ym. 2014). Nestemäiset ja puolikiinteät lääke muodot tarjoavat kiinteisiin lääke muotoihin nähden lisäksi usein mahdollisuuden joustavampaan annosteluun eläimen koon mukaisesti. Lisäksi etenkin puolikiinteiden lääke muotojen etuna on, että kiinteisiin lääke muotoihin verrattuna eläinten on huomattavasti vaikeampaa sylkeä puolikiinteitä valmisteita pois suuontelostaan annostelun yhteydessä. Lääkeaineiden kemiallinen epästabiilius sekä hajoaminen joko valon, hapen tai kosteuden vaikutuksesta aiheuttavat kuitenkin usein ongelmia nestemäisissä ja puolikiinteissä lääkevalmisteissa, minkä vuoksi useita annoksia sisältäviin moniannospakkauksiin joudutaan usein lisäämään säilöntä- ja/tai stabilointiaineita (European Pharmacopoeia 8.1). Säilöntäaineiden korkea pitoisuus valmisteissa saattaa joissakin tapauksissa rajoittaa riittävän suurten annosten antamista isoille eläimille, kun taas säilöntäaineettomat kerta-annokset saattavat asettaa rajoitteita annostelun joustavuuden suhteen (Sam ym. 2012). Kosteuden indusoiman

epästabiilisuuden vuoksi tämän työn tavoitteena on käyttää organogeelinäytteiden geelipohjana pelkkää kalaöljyä.

Puolikiinteillä, oraaliseen käyttöön tarkoitetuilla, eläinlääkevalmisteilla tarkoitetaan tavallisesti joko oraalipastoja tai -geelejä (European Pharmacopoeia 8.1). Valmisteet voivat sisältää joko yhtä tai useampaa kiinteää lääkeainetta, jotka valmisteista ja lääkeaineiden liukoisuudesta riippuen on joko liuotettu tai dispergoitu sopiviin väliaineisiin. Valmisteisiin joudutaan usein antimikrobisten säilöntäaineiden lisäksi liittämään oheen myös muita apuaineita helpottamaan muun muassa lääkeaineiden dispergointia tai suspensioiden muodostumista. Muita yleisesti käytössä olevia apuaineita ovat erilaiset sakeuttavat aineet ja emulsioiden muodostajat, puskuroivat aineet, kostutusaineet, solubilisoivat tai stabiloivat aineet sekä mahdolliset maku- ja/tai makeutusaineet. Taulukkoon 1 on koottu muutamien ulkomailla markkinoilla olevien, oraaliseen käyttöön tarkoitettujen geelimäisten ravintovalmisteiden koostumuksia. Kuten taulukosta 1 voidaan havaita, sisältävät ravintovalmisteet aktiivaineiden lisäksi koostumuksissaan myös useita muita komponentteja. Näiden lisäksi useimpiin valmisteisiin on lisätty vettä ja vaikka sitä ei varsinaisesti mainitakaan Pet AG:n Joint Solution Gel-valmisteiden raaka-aineluettelossa, sisältää valmiste kuitenkin markkinoijalta saatujen tietojen perusteella korkeintaan 6,0 % kosteutta (Pet AG 2014). Taulukossa 1 esiteltyt ravintovalmisteet eroavat tässä työssä valmistetuista organogeelinäytteistä sekä komponenttien lukumäärän että vedettömien valmistusolosuhteiden osalta. Vähäisempi komponenttien lukumäärä helpottaa valmistusprosessia ja vähentää valmistusprosessiin ja raaka-aineisiin liittyviä kustannuksia. Valmisteiden matalan vesipitoisuuden voidaan puolestaan arvioida parantavan valmisteiden stabiilisuutta sekä pidentävän niiden säilyvyyttä.



Taulukko 1. Muutamien ulkomailla markkinoilla olevien, oraaliseen käyttöön tarkoitettujen, geelimäisten ravintovalmisteiden koostumuksia. Valmistajalta saatujen tietojen mukaan lesitiini toimii Pet AG:n Joint Solution Gel-valmisteessa luonnollisena emulgaattorina ja piidioksidi veden absorboijana (Sutton sähköpostiviesti 2014).

Valmiste	Väliaine	Sakeuttavat/ emulgoivat aineet	Aktiiviatteet	Lähde
Excel Senior Vitamin Paste	Mallassiirappi, maissiöljy, vesi, melassi	Mono- ja diglyseridit, lesitiini, mannitoli	Glukosamiini, turskanmaksaöljy, tauriini, useita vitamiineja ja kivennäisaineita	Excel Cybervet 2014
Multi-Vite Gel	Vesi, maissisiirappi, hydrogenoitu kasviöljy, soijaöljy, maissiöljy	Steariinihappo, <b>lesitiini</b> , natriumstearoyyli-laktylaatti, setyylialkoholi, polysorbaatti 80, sokeri, ksantaanikumi	Vitamiineja ja kivennäisaineita	Nutri-Vet 2014
Felovite II®	Maissi- ja mallassiirappi, soijaöljy, vesi, turskanmaksaöljy, melassi	Metyyliiselluloosa	Turskanmaksaöljy, koliini, tauriini, inositoli, useita vitamiineja ja kivennäisaineita	Tomlyn 2014
Joint Solution Gel	Kasviöljy	Maissitärkkelys, sukroosi, dekstroosi, maltodekstriini, glyseriini, <b>lesitiini</b> , guarkumi, <b>piidioksidi</b>	Glukosamiini, kaoliini, riisiproteiini, kondroitiini-sulfaatti, biotiini	Pet AG 2014
Richard's Organics High Calorie Nutrient Paste	Soijaöljy, mallassiirappi, turskanmaksaöljy, vesi, kalaöljy, melassi	Dekstroosi, fruktoosi	Turskanmaksaöljy, kalaöljy, tauriini, useita vitamiineja ja kivennäisaineita	Synergy Labs 2014
Osteo-3 ® Joint & Hip Gel for Cats	Maissi- ja mallassiirappi, soijaöljy, vesi, kalaöljy, turskanmaksaöljy, melassi	Metyyliiselluloosa	Glukosamiini, kalaöljy, kondroitiini-sulfaatti, MSM, turskanmaksaöljy, muutamia vitamiineja ja kivennäisaineita	Drugs 2014

#### 4. KALAÖLJY ORGANOGEELIEN GEELIPOHJANA

Organogeelien geelipohja koostuu tavallisesti joko nestemäisestä parafiinista tai jostakin kasvi- tai eläinperäisestä öljystä (Balasubramanian ym. 2012). Organogeelien nestemäisen öljyfaasin on havaittu vaikuttavan organogeelien geeliytymisprosessiin sekä organogeelien makro- ja mikroskooppisiin ominaisuuksiin keskeisesti (Daman Huri ym. 2013). Tyydyttymättömistä öljyistä muodostuneiden geelien on yleisesti ottaen havaittu olevan tyydyttyneistä öljyistä muodostuneita geelejä vahvempia (Dey ym. 2011). Tämän on arveltu johtuvan tyydyttymättömien ja tyydyttyneiden öljyjen välisistä rakenne-eroista. Pääasiallisesti pehmeitä, tyydyttymättömiä omega-3-rasvahappoja sisältävien kalaöljyjen voidaankin rasvahappokoostumuksensa perusteella arvioida muodostavan suhteellisen vahvoja organogeelejä.

##### 4.1 Kalaöljyn terveysvaikutukset

Kalaöljyn sisältämien n-3-sarjan rasvahappojen on jo pitkään tiedetty ehkäisevän sydän- ja verisuonisairauksien riskiä (Dyerberg ym. 1978). Useat aiheesta tehdyt havainnoivat sekä satunnaistetut ja kontrolloidut kliiniset tutkimukset ovatkin päätyneet lopputulokseen, jonka mukaan hyvin pitkäketjuisten n-3-sarjan rasvahappojen saanti joko ruokavaliosta tai kalaöljyvalmisteista saattaa pienentää sydän- ja verisuonisairauksien riskiä. Erityistä huomiota n-3-sarjan rasvahapoista on kiinnitetty eikosapentaeeni- (EPA) ja dodekaheksaeenihappoihin (DHA), joiden pääasiallisina ravintolähteinä toimivat kalat sekä erityisesti kalaöljyt. EPA:n ja DHA:n on sydän- ja verisuonisairauksien osalta havaittu vähentävän rytmihäiriöiden esiintymistä, pienentävän veren triglyseridipitoisuuksia ja verenpainetta sekä vähentävän verihiutaleiden aggregaatiota (Appel ym. 1993; Nair ym. 1997; Kristensen ym. 2001; Kris-Etherton ym. 2002).

Sydän- ja verisuonisairauksien lisäksi kalaöljyillä on arveltu olevan positiivisia vaikutuksia myös useiden muiden sairausryhmien hoidossa ja/tai ehkäisyssä (Zamaria 2004). Anti-inflammatoristen vaikutustensa johdosta kalaöljyjen on arveltu helpottavan muun muassa tulehduksellisten suolistosairauksien ja erilaisten nivelongelmien oireita

(Stenson ym. 1992; Goldberg ja Katz 2007). Kalaöljyjen anti-inflammatorisen vaikutuksen on arvioitu johtuvan n-3-sarjan rasvahappojen kyvystä kilpailla arakidonihapon kanssa syklo-oksigenaasin ja lipoksigenaasin substraatin paikasta saaden aikaan aiempaa heikompien eikosanoidien, prostaglandiinien ja leukotrieenien muodostumista (Stenson ym. 1992). Tulehduksellisten suolistosairauksien ja nivelongelmien lisäksi kalaöljyillä on arveltu olevan positiivisia vaikutuksia myös ainakin lasten ADHD:n, masennuksen, Alzheimerin taudin, diabeteksen, astman, erilaisten allergioiden, psoriasiksen sekä joidenkin syöpien ehkäisyssä ja/tai hoidossa (Zamaria 2004).

Kalaöljyn omega-3-rasvahappojen on havaittu parantavan nivelrikkoa sairastavien koirien nivelten liikkuvuutta (Roush ym. 2010). Vaikutusta on yritetty selittää omega-3-rasvahappojen kroonista tulehdusta hillitsevien ominaisuuksien perusteella, sillä nivelten kroonisen tulehduksen on havaittu vaurioittavan niveliä elimistön puolustusjärjestelmän ja nivelrustoa hajottavien entsyymien liiallisen aktiivisuuden perusteella (Zainal ym. 2009). Kalaöljyn sisältämän EPA:n onkin tähän liittyen havaittu hillitsevän sekä immuuniaktivaatiota että nivelruston tuhoamiseen osallistuvia proteaaseja (Curtis ym. 2000).

#### 4.2 Kalaöljy organogeeleissä

Kalaöljyä voidaan organogeeliformulaatioissa hyödyntää monityydyttymättömien, elimistölle välttämättömien rasvahappojen perusteella geelipohjien lisäksi myös ravitsemuksellisinä komponentteina (Langford 2011). Organogeelien geelipohjien kannalta kalaöljyjen vahvuutena pidetään niiden matalaa kosteuspitoisuutta, joka suojaa sekä valmisteita mikrobiologiselta kontaminaatiolta että valmisteiden sisältämiä lääkeaineita hapettumiselta ja aktivoitumiselta (EFSA 2010). Kalaöljyjen on lisäksi Langfordin (2011) havaintojen perusteella arvioitu ainakin osittain kapseloivan kiinteitä lääkeaineita, peittäen näin kiinteiden lääkeaineiden mahdollisesti epämiellyttävää hajua tai makua sekä parantaen niiden maistuvuutta. Langfordin patentissa esitellyn tutkimuksen mukaan kalaöljyn kanssa formuloituja kiinteitä lääkeaineita suostui tutkimukseen osallistuneista 24 koirasta yhteensä 21 yksilöä nauttimaan

kokonaisuudessaan, kun taas pelkkiä kiinteitä, jauhemaisia lääkeaineita suostui yhteensä 24 koirasta vain 6 yksilöä nauttimaan kokonaisuudessaan.

Kalaöljyjä on onnistuneesti käytetty geelipohjina ainakin muutamissa erilaisissa, viime vuosina kehitellyissä farmaseuttisissa sovelluksissa (Richards ym. 2006; Daman Huri ym. 2013; Rehman ym. 2014). Lääkeaineista ainakin diklofenaakki, ketoprofeeni, asetyylisalisyylihappo ja bentsoyyliperoksidi on tutkimuksissa onnistuneesti yhdistetty kalaöljyn kanssa erilaisissa organogeelipohjaisissa systeemeissä. Kalaöljyillä on topikaalisissa valmisteissa havaittu olevan anti-inflammatorista aktiviteettia tehostava vaikutus ja kalaöljyjen sisältämien omega-3-rasvahappojen sekä muiden pitkäketjuisten monitydyttymättömien rasvahappojen onkin tämän perusteella arvioitu muuntelevan muun muassa IL-10, TNF- $\alpha$  ja IFN- $\gamma$  tuotantoa (Daman Huri ym. 2013). NSAID-lääkeaineiden ja kalaöljyjen sisältämien EPA:n ja DHA:n on lisäksi synergisesti havaittu parantavan niitä sisältävien valmisteiden permeaatiota ihon läpi nestemäisissä lääkevalmisteissa (Heard ym. 2003). NSAID-lääkeaineiden lisäksi kalaöljyjen on todettu lisäävän myös eräiden muiden lipofiilisten lääkeaineiden biologista hyötyosuutta (Daman Huri ym. 2013). Joitakin viitteitä lipofiilisten EPA:n ja DHA:n mahdollisesta retentiosta topikaalisten sovellusten organogeelimatrikseihin on kuitenkin myös esitetty (Richards ym. 2006).

## 5. PIIDIOKSIDI JA LESITIINI ORGANOGELAATTOREINA

Organogelaattoreja on tässä työssä yleisellä tasolla käsitelty aiemmin luvussa 3.1. Tässä luvussa työssä sakeuttavina aineina käytettyjen kolloidaalisen piidioksidin ja lesitiinin ominaisuuksia sekä käyttöä erilaisissa organogeeliformulaatioissa on kuitenkin tarkasteltu syvällisemmällä tasolla.

### 5.1 Piidioksidi

Kolloidaalinen piidioksidi eli silika on kevyt, hajuton, mauton ja väriltään sinertävän valkoinen amorfinen jauhe, jonka molekyylipaino on 60,08 g/mol (Hapgood 2009a).

Kolloidaalinen piidioksidi voidaan Euroopan Farmakopean mukaisesti jakaa kahteen eri päämuotoon: hydrofiiliseen, vedettömään piidioksidiin sekä vähemmän tunnettuun hydrofobiseen piidioksidiin (European Pharmacopoeia 8.1). Näistä kahdesta kolloidaalisen piidioksidin muodosta vedetön kolloidaalinen piidioksidi on farmaseuttisissa sovelluksissa yleisemmin käytetty muoto (Hapgood 2009a; Hapgood 2009b). Joissakin erityistapauksissa myös hydrofobisen kolloidaalisen piidioksidin käyttö on kuitenkin mahdollista.

### 5.1.1 Ominaisuudet

Vedetöntä kolloidaalista piidioksidia on kaupallisesti saatavilla erilaisina laatuina, kuten saostettuna (*precipitated silica*) tai höyrystettynä (*fumed silica*) piidioksidina. Erilaiset piidioksidilaadut on valmistettu tuotantoprosessia muokkaamalla (Hapgood 2009a). Tuotantoprosessin muutokset eivät vaikuta kolloidaalisen piidioksidin pitoisuuteen, refraktiiviseen indeksiin, väriin tai amorfiseen muotoon, mutta partikkelikokoon, pinta-alaan tai tiheyteen tuotantoprosessien muutoksilla saattaa kuitenkin olla vaikutusta. Piidioksidilaatujen spesifisen pinta-alan on havaittu vaikuttavan piidioksidipartikkelien agglomeraation asteeseen keskeisesti, suurempien spesifisten pinta-alojen tehostaessa aggregaattien muodostumista (Aerosil Technical Information No. 1279). Vedettömän kolloidaalisen piidioksidin tyypillisimpiä fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia on kuvattu taulukossa 2.

Taulukko 2. Vedettömän kolloidaalisen piidioksidin tyypillisimpiä fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia (Hapgood 2009a).

<b>pH</b>	4 % vesipohjainen dispersio: 3.8–4.2 19 % vesipohjainen dispersio: 3.5–4.0
<b>Tiheys (bulkkitiheys)</b>	0,029–0,042 g/cm <sup>3</sup>
<b>Tärytiheys</b>	Laadusta ja valmistajasta riippuen 0,04–0,22 g/cm <sup>3</sup>
<b>Sulamispiste</b>	1600 °C
<b>Partikkelikokojakauma</b>	Primäärinen partikkelikoko 7–16 nm
<b>Refraktiivinen indeksi</b>	1.46
<b>Liukoisuus</b>	Käytännössä orgaanisiin liuottimiin, veteen ja happoihin liukenematon. Liukenee kuitenkin vetyfluorihappoon ja kuumiin alkalihydroksidien liuoksiin. Veden kanssa piidioksidi muodostaa kolloidaalisia dispersioita.
<b>Spesifinen pinta-ala</b>	Laadusta riippuen 100–400 m <sup>2</sup> /g

Kolloidaalista piidioksidia on farmaseuttisissa sovelluksissa käytetty muun muassa adsorboivana aineena, viskositeettia kohottavana aineena, emulsioiden stabiloijana, suspensioiden muodostajana, massan liukuaineena, tablettien hajotusaineena sekä suspensioiden kiinteiden partikkelien aggregoitumista estävänä aineena (Hapgood 2009a). Kolloidaalisen piidioksidin avulla on lisäksi mahdollista stabiloida valmisteita lämpötilan vaikutuksilta. Nestemäisissä ja puolikiinteissä valmisteissa kolloidaalisen piidioksidin on havaittu toimivan tiksotrooppisena sakeuttajana. Annostelun yhteydessä tiksotrooppiset valmisteet on kuitenkin tasaisten lääkeaineannosten varmistamiseksi ollut ravistelun seurauksena mahdollistaa saattaa tasa-aineisiksi.

Se, kuinka paljon kolloidaalinen piidioksidi nostaa valmisteiden viskositeettia, riippuu väliaineiden polaarisuudesta (Hapgood 2009a). Polaaristen liuottimien on saman viskositeettiasteen saavuttaakseen yleisesti ottaen havaittu tarvitsevan ei-polaarisia liuottimia suurempia piidioksidipitoisuuksia. Kolloidaalisen piidioksidin aikaansaama viskositeetin kasvu ei riipu systeemien lämpötilasta, mutta muutokset systeemien pH:ssa saattavat kuitenkin vaikuttaa valmisteiden viskositeetteihin. Nestemäisissä systeemeissä vedettömän kolloidaalisen piidioksidin on havaittu nostavan valmisteiden viskositeettia pH:n ollessa alle 7.5. Kun systeemien pH nousee yli 7.5, heikenevät kolloidaalisen piidioksidin viskositeettia kohottavat ominaisuudet kuitenkin nopeasti. Systeemien pH:n noustessa reippaasti emäksisen puolelle, piidioksidien on liuetessaan havaittu muodostavan silikaatteja. Silikaattien muodostumisen on arveltu olevan syynä kolloidaalisen piidioksidin viskositeettia kohottavien ominaisuuksien heikentymiselle.

Hydrofiilinen, vedetön kolloidaalinen piidioksidi on hygroskooppinen aine, joka kykenee adsorboimaan suuriakin määriä nesteitä muuttumatta silti itse kuitenkaan nestemäiseksi (Hapgood 2009a). Kolloidaalisen piidioksidin on oraalisella ja topikaalisella antoreitillä havaittu olevan ärsyttämätön ja ei-toksinen apuaine. Intraperitoneaalisesti ja subkutaanisesti annosteltuna kolloidaalinen piidioksidi saattaa kuitenkin aiheuttaa paikallisia reaktioita ja/tai granuloomia, eikä kolloidaalista piidioksidia tämän vuoksi suositellakaan parenteraalisesti annosteltavaksi.

Hydrofobinen kolloidaalinen piidioksidi adsorboi vähemmän kosteutta kuin vedetön kolloidaalinen piidioksidi, minkä vuoksi se on usein hyvä valinta kosteusherkkien yhdisteiden formuloinnissa (Hapgood 2009b). Hydrofobisen kolloidaalisen piidioksidin vaikutus liuosten viskositeettiarvoihin on kuitenkin vedetöntä piidioksidia vähäisempi, vaikka myös sen onkin jossain määrin havaittu kykenevän sakeuttamaan orgaanisia liuottimia. Hydrofobisen piidioksidin heikomman viskositeettia kohottavan vaikutuksen on arveltu johtuvan silikapartikkelien pintojen vapaiden silanoliryhmien sitomisesta (Aerosil Technical Information No. 1279). Vedettömään, hydrofiiliseen piidioksidiin nähden hydrofobisella piidioksidilla on kuitenkin havaittu olevan muita edullisia ominaisuuksia kuten parempi valuvuus, miellyttävämpi ihotuntuma ja paremmat vettä hylkivät ominaisuudet. Hydrofobisten silikalaatujen on lisäksi useissa tapauksissa havaittu muodostavan vedetöntä, höyrystettyä piidioksidia stabiilimpia organogeelejä orgaanisten liuottimien kostutusvaikutuksen ollessa hydrofobisilla silikalaaduilla hydrofiilisiä silikalaatuja tehokkaampi.

#### 5.1.2 Piidioksidi organogelaattorina

Kolloidaalisen piidioksidin on havaittu muodostavan stabiileja dispersioita ainakin metanolin, etanolin ja asetonin kanssa (Benitez ym. 1971). Dispersioiden epätavallisen stabiiliuden on arvioitu johtuvan silikapartikkelien pintojen välisestä lyhyen kantomatkan repulsiosta (Chapel 1994). Tarkasta repulsion taustalla olevasta mekanismista ei ole varmuutta, mutta erilaisia teorioita on kuitenkin esitetty (Raghavan ym. 2000). Aikaisemmin ajateltiin, että silikapartikkelien välinen lyhyen kantomatkan repulsio johtuisi partikkelien pinnalle vetysidosten vaikutuksesta muodostuneesta immobilisoidusta nestekerroksesta. Uudemmissa tutkimuksissa on kuitenkin esitetty, että repulsio voisi olla seurausta myös noin 1 nm paksuisesta silikapartikkelien ympärille muodostuneesta silikageelikerroksesta, joka steerisenä esteenä saisi partikkelien välille aikaan lyhyen kantomatkan repulsiovoimia. Vaikka teoriat repulsion taustalla olevasta mekanismista ovatkin erilaisia, voidaan silikapartikkelien pinnan merkitys repulsion muodostumiselle osoittaa merkitykselliseksi molemmissa teorioissa.

Kolloidaalinen piidioksidi on stabiilien dispersioiden muodostamiskyvyn lisäksi tunnettu myös kyvystään kohottaa orgaanisten liuottimien viskositeettia (Khan ja Zoeller 1993). Stabiilien dispersioiden muodostuessa partikkelien välisten repulsiovoimien seurauksena, tarvitaan viskositeetin kohottamiseen puolestaan partikkelien välisiä sidoksia (Raghavan ym. 2000). Kun tällaisia sidoksia muodostuu partikkelien välille kattavasti läpi koko dispersion, voidaan muodostuvaa rakennetta kutsua kolloidaaliseksi geeliksi. Geeliytymisen aikana viskoosi neste saa osakseen myös elastisia ominaisuuksia.

Kolloidaalista piidioksidia on onnistuneesti käytetty geelinmuodostajana ainakin muutamien erilaisten kasviöljy-, nestemäinen parafiini- ja isopropyylimyristaattipohjaisten organogeelien valmistuksessa (Balasubramanian ym. 2012). Pääasiallisen geeliytymistä edistävän voiman on arveltu johtuvan kolloidaalisen piidioksidin pinnan silanoliryhmien välille muodostuvista vetysidoksista (Raghavan ym. 2000). Aiemmin arveltiin, että kolloidaalista piidioksidia olisi mahdollista käyttää geelinmuodostajana vain tapauksissa, joissa geelipohjan liuotinmolekyylit eivät sisällä polaarisia, vetysidosten muodostukseen kykeneviä funktionaalisia ryhmiä. Teoria perustui käsitykseen, jonka mukaan liuotinmolekyylien polaariset, vetysidosten muodostukseen kykenevät funktionaaliset ryhmät vuorovaikuttaisivat kolloidaalisen piidioksidin pinnan silanoliryhmien kanssa heikentäen silikapartikkelien välille muodostuvia vetysidoksia. Uudempien tutkimusten mukaan se, muodostuuko kolloidaalisesta piidioksidista ja orgaanisesta liuottimesta neste vai geeli, riippuu kuitenkin orgaanisten liuotinmolekyylien ja silikapartikkelien pintojen välille muodostuneiden vetysidosten voimakkuudesta. Kun liuotin muodostaa piidioksidin pinnalla olevien silanoliryhmien kanssa vetysidoksia, muodostuu jokaisen silikapartikkelin pinnalle solvaatiokerros, jolloin silikapartikkelien väliset lyhyen kantomatkan repulsiiviset solvaatiovoimat estävät silikapartikkeleita tarttumasta toisiinsa ja syntyy nestemäinen lopputuote. Mikäli liuottimella on silikapartikkelien pinnan silanoliryhmien kanssa kuitenkin vain heikko vuorovaikutus, eikä liuotinmolekyylien ja silikapartikkelien pinnan silanoliryhmien välille muodostu solvaatiokerrosten kannalta riittävästi vetysidoksia, muodostuu silikapartikkelien silanoliryhmien välille vetysidoksia. Muodostuvat vetysidokset sitovat silikapartikkeleita toisiinsa ja saavat aikaan valmisteiden geeliytymistä.



Silikapartikkelien välille muodostuneet vetysidokset vaikuttavat geeliytymisen lisäksi myös silikageelien tiksotrooppiseen käyttäytymiseen keskeisesti (Balasubramanian ym. 2012). Heikot vetysidokset silikapartikkelien välillä saavat aikaan geelien paksuuntumista säilytyksen aikana. Kun geelejä säilytyksen jälkeen ravistellaan, pienenee valmisteiden viskositeetti kuitenkin heikkojen vetysidosten rikkoutuessa nopeasti.

Kolloidaalista piidioksidia on onnistuneesti käytetty organogelaattorina ainakin kahdessa erilaisessa diklofenaakkia sisältävässä valmisteessa, joista toisessa orgaanisena geelipohjana toimi seesamiöljy ja toisessa nestemäinen parafiini (Goupale ja Raj Kapoor 2011). Diklofenaakin lisäksi lääkeaineista myös ainakin drospirenoni on onnistuneesti yhdistetty kolloidaalisen piidioksidin kanssa keskipituisia triglyseridejä sisältävään MCT-öljypohjaan (Nippe ja General 2014). Edellä mainittujen farmaseuttisten sovellusten lisäksi höyrystettyä piidioksidia on litiumakkujen kehityksessä käytetty myös yhdessä 1,3:2,4-di-O-metyyli-bentsylideeni-D-sorbitolin (MDBS) kanssa propyleenikarbonaattipohjaisissa organogeeleissä (Basrur ym. 2013). Höyrystetyn piidioksidin ei yksinään havaittu kykenevän geelien muodostukseen propyleenikarbonaattiliuottimien kanssa, mutta sen havaittiin kuitenkin parantavan MDBS:llä sakeutettujen geelien vahvuutta mahdollisesti silikapartikkelien ja MDBS-nanosäikeiden välille muodostuneiden vetysidosten vaikutuksesta.

Organogeelien geelinmuodostuksen kannalta silikaorganogeelien vahvuuksina pidetään niiden valmistusprosessia, joka useista muista organogelaattoreista poiketen on mahdollista toteuttaa myös huoneenlämpötilassa (Goupale ja Raj Kapoor 2011). Muita silikaorganogeelien vahvuuksia ovat niiden muodostamat lämpöresistentit, korkeaviskoosiset organogeelit sekä mahdollisuus formuloida piidioksidi täysin vedettömiin valmisteisiin, jotka vedettömistä olosuhteistaan johtuen ovat tyypillisesti sekä hapettumisen että mikrobiologisen kontaminaation suhteen stabiilimpia. Piidioksidia käytetään organogeelien sakeuttavana aineena usein yksinään, mutta muista yhdisteistä ainakin etyleeniglykolin tiedetään kuitenkin synergistisesti nostavan piidioksidisysteemien viskositeettia ei-polaarisissa ja semipolaarisissa liuottimissa (Aerosil Technical Information No. 1279).

### 5.1.3 Kiinteiden silikarakenteiden muodostuminen

Organogelaattorina toimimisen lisäksi kolloidaalisen piidioksidin on organogeeleissä havaittu muodostavan kiinteitä, organogeelien geeliverkoston muotoisia huokoisia rakenteita erityisen *sol-gel*-prosessin seurauksena (Craythorne ym. 2009). Organogelaattorien muodostamat kolmiulotteiset matriksit toimivat organogeeleissä pohjana, jonka päälle kiinteät, nanokuituiset silikamateriaalit rakentuvat (Marr ym. 2013). Sekä organogeelien kolmiulotteisen verkoston että kiinteiden silikarakenteiden muodostuminen tapahtuvat tyypillisesti samanaikaisesti (Huang ja Weiss 2006). Koska organogeelien geelitymisen on silikarakenteiden muodostumiseen verrattuna havaittu usein olevan huomattavasti nopeampi prosessi, ovat kuitumaiset organogelaattorien templaattit usein muodostuneet jo ennen kiinteiden silikarakenteiden merkittävää rakentumista. Silikamateriaalien transkription on havaittu parantavan organogeelien termostabiilisuutta, vetolujuutta sekä mekaanista ja kemiallista stabiilisuutta (Schuleit ja Luisi 2001; Huang ja Weiss 2006). Toisaalta organogeelien on edellä kuvatun mukaisesti havaittu toimivan myös pohjana kiinteiden silikarakenteiden, kuten erilaisten putkien, sauvojen tai heliksien muodostumiselle, kun geelipohjana käytetty neste poistetaan kiinteiden rakenteiden alta joko erottamalla tai sintraamalla.

### 5.2 Lesitiini

Lesitiini, josta useissa kirjallisuuslähteissä käytetään myös nimitystä fosfatidyylikoliini tai 1,2-diasyyli-*sn*-glysero-3-fosfatidyylikoliini, on ihmisissä luontaisesti esiintyvä yhdiste (Sheng 2009). Yleisesti ottaen lesitiini käsitetään neutraalien lipidien kuten triglyseridien tai rasvahappojen; polaaristen lipidien kuten fosfo- tai glykolipidien sekä hiilihydraattien monimutkaisena seoksena, jonka pääasiallisia komponentteja ovat fosfatidyylikoliini, fosfatidyylietanoliamiini, fosfatidyyliiseriini ja fosfatidyyli-inositoli (Cherry ym. 1981). Teollisuudessa raaka-aineena käytettävä lesitiini on tavallisesti peräisin joko kananmunista, soijapavuista tai auringonkukista (Sheng 2009). Lesitiinin fysikaaliset ominaisuudet ja koostumus ovat riippuvaisia paitsi lesitiinin lähteestä ja puhdistusasteesta myös erityisesti sen sisältämistä polaarista lipideistä.

### 5.2.1 Ominaisuudet

Lesitiiniä on pinta-aktiivisten ominaisuuksiensa vuoksi käytetty kosmetiikka- ja elintarviketeollisuuden lisäksi myös erilaisissa farmaseuttisissa sovelluksissa joko dispergoivana, emulgoivana tai stabiloivana yhdisteenä jo vuosikymmenten ajan (Sheng 2009). Lesitiinit ovat amfifiilisiä molekyylejä, jotka öljyä ja vettä sisältävissä systeemeissä asettuvat toisiinsa sekoittumattomien faasien rajapinnalle edistäten emulsioiden muodostumista ja parantaen niiden stabiilisuutta. Sopivissa olosuhteissa lesitiinien fosfolipidien on niiden amfifiilisen luonteen vuoksi havaittu muodostavan erilaisia membraanirakenteita kuten lamelleja, vesikkeleitä, misellejä tai tämän työn kannalta keskeisiä organogeelejä spontaanisti (Vintilou ja Leroux 2008).

Joidenkin kliinisten tutkimusten mukaan lesitiineillä on havaittu olevan maksaa suojaavaa vaikutusta ja niiden käyttöä onkin tämän vuoksi yritetty perustella muun muassa erilaisten myrkytystilojen, alkoholin aiheuttaman maksakirroosin sekä kroonisen maksatulehduksen hoidossa (Teng ja Zeisel 2011). Maksaa suojaavien ominaisuuksien lisäksi lesitiinien on havaittu alentavan plasman kokonaiskolesterolia, säätelevän rasvojen kulkua elimistössä sekä toimivan prostaglandiinien synteesien lähtöaineena. Asetyylikoliinin biosynteesin kautta lesitiineillä on arvioitu olevan positiivisia vaikutuksia myös muistin ja lihastoiminnan kannalta.

Lesitiinit ovat mikrobiologiselle hajoamiselle herkkiä, hygroskooppisia yhdisteitä, jotka hapettuvat ja tummuvat herkästi kuumennettaessa (Sheng 2009). Fysikaaliselta olomuodoltaan lesitiinien on niiden rasvahappokoostumuksen perusteella havaittu vaihtelevan viskooseista liuoksista aina jauheisiin asti. Topikaalisessa annostelussa lesitiinin on havaittu olevan ärsyttämätön ja herkistämätön apuaine. Muutamia tyypillisimpiä lesitiinien fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia on kuvattu taulukossa 3.

Taulukko 3. Lesitiinin tyypillisimpiä fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia (Sheng 2009).

<b>Tiheys</b>	Nestemäinen lesitiini: $0,97 \text{ g/cm}^3$ Jauhemainen lesitiini: $0,5 \text{ g/cm}^3$
<b>Isoelektrinen piste</b>	n. 3,5
<b>Liukoisuus</b>	Liukenee alifaattisiin ja aromaattisiin hiilivetyihin, halogenoituihin hiilivetyihin, mineraaliöljyihin ja rasvahappoihin. Käytännössä kylmiin kasvi- ja eläinpohjaisiin öljyihin, polaarisiin liuottimiin ja veteen liukenematon. Veden kanssa lesitiini muodostaa emulsioita.

### 5.2.2 Lesitiini organogelaattorina

Lesitiinimolekyylien on orgaanisissa liuottimissa havaittu muodostavan käänteisiä misellirakenteita fosfolipidikomponenttinsa uudelleenjärjestäytymisen seurauksena (Vintiloiu ja Leroux 2008). Kun tällaisiin käänteisiin misellirakenteita sisältäviin liuoksiin on sittemmin lisätty pieniä määriä polaarisia liuottimia, on sylinterimäisten, käänteisten misellien havaittu kasvavan ja lopulta kietoutuvan toistensa ympärille muodostaen geeleille tyypillisen kolmiulotteisen verkoston (Kuva 3). Lesitiinien on havaittu toimivan organogelaattoreina yksinään, mutta joissakin tapauksissa niiden oheen voidaan liittää myös muita yhdisteitä kuten sorbitaanitristearaatteja tai polyetyleeniglykolimonolaureaatteja (Khromova ym. 2001; Pernetti ym. 2007).



Kuva 3. Lesitiiniorganogeelien muodostuminen (muokattu Kumar ja Katare 2005).

Lesitiiniliuosten misellien välisissä molekulaarisissa vuorovaikutuksissa tapahtuvien muutosten on havaittu aiheuttavan suurta vaihtelua lesitiiniä sisältävien organogeelien reologisissa parametreissa (Shchipunov ym. 1998). Systeemien viskositeettien kasvun

onkin havaittu johtuvan nimenomaan käänteisten tubulaaristen misellien kasvusta ja limittäytymisestä eikä nesteiden järjestäytymisestä kuten binäärisissä vesilesitiinisysteemeissä (Schurtenberger ym. 1990; Shchipunov ja Shumilina 1996). Tutkittaessa käänteisten misellien kietoutumista toistensa ympärille ovat lesitiinien fosfaattiryhmien ja polaaristen liuotinmolekyylien välille muodostuneet vetysidokset osoitettu merkityksellisiksi (Shchipunov ja Shumilina 1996). Vetysidoksilla toisiinsa liittyneiden lesitiinin fosfaattiryhmien ja polaaristen liuotinmolekyylien on havaittu muodostavan lineaarisia rakenteita, joiden on sittemmin nähty pakkautuvan suuriksi, käänteisten misellien päällekkäisiksi ja kietoutuneiksi kolmiulotteisiksi rakenteiksi. Lesitiiniorganogeelien käänteisten misellien muodostamien rakenteiden on havaittu muistuttavan konsentroitujen liuosten risteämättömien polymeerien rakennetta (Kumar ja Katare 2005). Tästä syystä lesitiiniä sisältäviä systeemejä kutsutaankin usein polymeerinkaltaisiksi miselleiksi, mutta rakenteidensa perusteella niistä voidaan käyttää myös nimitystä matomaiset tai lankamaiset misellit.

Lesitiinien on havaittu muodostavan organogeelejä veden lisäksi ainakin glyserolin, formamidin ja etyleeniglykolin kanssa, mutta etanolin ja dietyleeniglykolin kanssa organogeelejä ei kuitenkaan ole saatu muodostettua (Shchipunov ja Shumilina 1996). On arvioitu, että ero geelin muodostavien ja muodostamattomien polaaristen liuottimien välillä liittyisi liuotinmolekyylien polaarisuudesta johtuvaan orientaatioon ja sijaintiin lesitiinimolekyylien välissä (Shchipunov ja Shumilina 1995). Tämän havainnon pohjalta useimmilla lesitiiniorganogeelejä muodostavilla polaarilla liuottimilla onkin sittemmin havaittu olevan voimakas taipumus vetysidosten muodostukselle. Vetysidosten luovutuspotentiaalin on arvioitu olevan tärkeämpi tekijä geelien muodostumisessa kuin liuotinmolekyylien potentiaali vetysidosten vastaanottamiselle. Geelejä muodostavilla polaarilla liuottimilla on voimakkaan vetysidosten muodostamistaipumuksen lisäksi havaittu tyypillisesti olevan myös korkea pintajännitys sekä suhteellisen suuri dielektrinen vakio (Kumar ja Katare 2005). Polaaristen liuottimien lisäksi Scartazzini ja Luisi (1988) ovat osoittaneet myös geelipohjana toimivat orgaaniset liuottimet geelien stabiilisuuden kannalta merkityksellisiksi. Mitä apolaarisempia orgaanisia liuottimia geelien on lesitiinien ja polaaristen liuottimien lisäksi havaittu sisältävän, sitä paremmin

lesitiinimolekyylien on havaittu järjestäytyvän ja sitä stabiilimpia muodostuvien geelien on havaittu olevan.

Polaaristen liuottimien arveltiin pitkään olevan lesitiiniorganogeelien geeliytymisen kannalta välttämättömiä, mutta sittemmin on havaittu, että orgaanisia liuottimia ja lesitiiniä sisältäviä seoksia on polaaristen liuottimien lisäksi mahdollista sakeuttaa myös ainakin sorbitaanitristearaatin,  $\alpha$ -tokoferolin ja sitosterolin avulla (Pernetti ym. 2007; Han ym. 2013; Nikiforidis ja Scholten 2014). Pernetti (2007) tutkimusryhmineen havaitsivat auringonkukkaöljyjen sakeutuvan geelimäisiksi seoksiksi ilman polaarisia liuottimia, kun öljyjen sekaan lisättiin auringonkukkalesitiinin lisäksi pieniä määriä sorbitaanitristearaattia. Tutkijat arvelivat geeliytymisen johtuvan sorbitaanitristearaatin kyvystä muodostaa lesitiinin läsnä ollessa neulamaisia ja levymäisiä kiderakenteita, joiden on arvioitu toimivan organogeelien kolmiulotteisten verkkorakenteiden rakennusmateriaaleina sorbitaanitristearaatin tavanomaisia kiderakenteita tehokkaammin. Sorbitaanitristearaatin kiderakenteiden muutokset ovat mahdollisia, sillä lesitiinien on havaittu kykenevän kidemuotojen modifiointiin sitoutuessaan kiteiden pinnoille fosfaatti- ja karbonyyliryhmiensä happiatomien välityksellä (Yani ym. 2011). Kidemuotojen modifioinnin lisäksi lesitiinien on havaittu suosivan sorbitaanitristearaattikiteiden välisten heikkojen sidosten muodostumista (Pernetti ym. 2007). Tämä edistää sorbitaanitristearaattikiteiden välistä aggregaatiota ja helpottaa kolmiulotteisten verkostojen muodostumista. Sorbitaanitristearaatin lisäksi myös sitosterolin on auringonkukkaöljypohjaisissa seoksissa havaittu muodostavan lesitiinien läsnä ollessa sorbitaanitristearaatin kaltaisia neulamaisia kiderakenteita (Han ym. 2013).

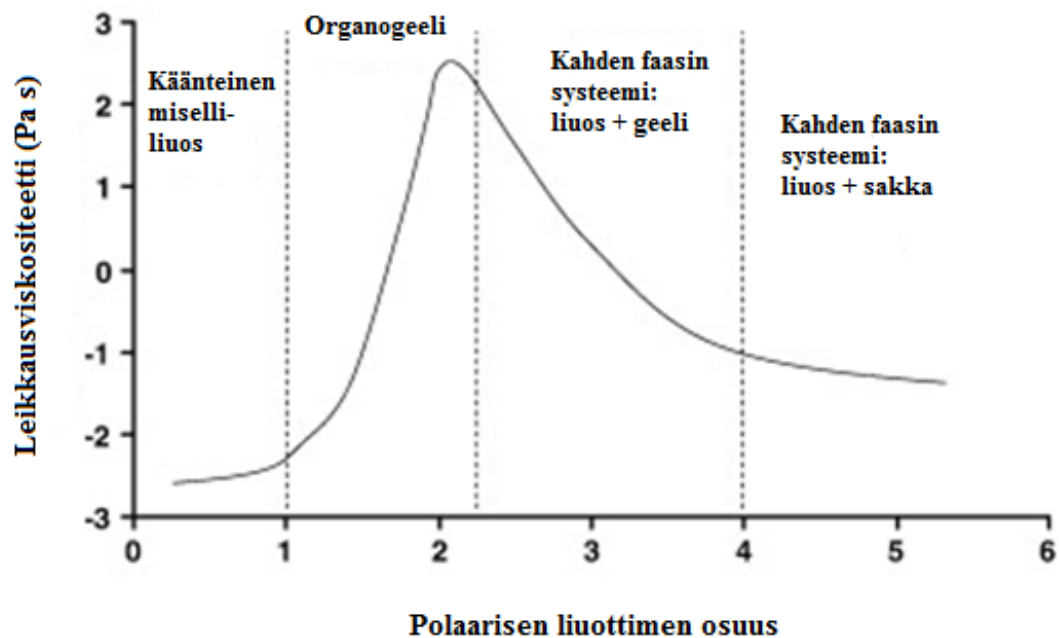
Sorbitaanitristearaatin ja sitosterolin lisäksi myös  $\alpha$ -tokoferolin on havaittu sakeuttavan auringonkukkaöljypohjaisia, lesitiiniä sisältäviä, seoksia ilman polaarisia liuottimia (Nikiforidis ja Scholten 2014). Puhdistetun lesitiinin ja  $\alpha$ -tokoferolin havaittiin tutkimuksessa muodostavan geelejä, kun niitä lisättiin auringonkukkaöljypohjaisiin seoksiin suhteessa 1:1. Tutkijat arvelivat geelien muodostumisen johtuvan lesitiinimolekyylien muodostamien käännteisten misellien pakkautumiseen liittyvistä muutoksista. Lesitiinimolekyylit sisältävät rakenteessaan pienen hydrofiilisen alueen sekä suuren hydrofobisen alueen, minkä vuoksi niiden on tyypillisesti havaittu

pakkautuvan pieniksi, sylinterimäisiksi käänteisiksi misellirakenteiksi. Suuren hydrofiilisen alueen sisältämien  $\alpha$ -tokoferolimolekyylien lisääminen lesitiinin käänteisten misellirakenteiden seoksiin sai tutkijoiden arvioiden mukaan todennäköisesti polaaristen ryhmien vuorovaikutusten välityksellä aikaan polymeerienkaltaisten, supramolekulaaristen misellirakenteiden muodostumista (Kuva 1). Kuten luvussa 3.1.2 on kuvattu, kietoutuvat supramolekulaariset rakenteet toistensa ympärille muodostaen rakenteita, joita on edelleen mahdollista stabiloida heikoilla ketjujen välisillä vuorovaikutuksilla kuten vetysidoksilla tai van der Waalsin vuorovaikutuksilla. Tutkimuksessa havaittu lesitiiniä ja  $\alpha$ -tokoferolia sisältävien geelien herkkyys leikkausvoimille tukee tutkijoiden teoriaa supramolekulaarisista, fysikaalisista vuorovaikutuksista. Vaikka lesitiiniä ja  $\alpha$ -tokoferolia sisältäviä geelejä onkin mahdollista valmistaa ilman polaarisia liuottimia, on pienten vesimäärien havaittu kuitenkin parantavan näin muodostuneiden geelien vahvuutta.

Lesitiiniä ja  $\alpha$ -tokoferolia sisältävien organogeelien ongelmana ovat niiden tarvitsemat suuret, jopa 25 % (m/m), sakeuttavien aineiden pitoisuudet (Nikiforidis ja Scholten 2014). Lesitiiniä ja sorbitaanitristearaattia sisältävien geelien heikkoutena ovat puolestaan niiden matala sulamispiste sekä pinta-aktiivisesta luonteesta johtuva herkkyys vedelle (Co ja Marangoni 2012). Korkeat apuainepitoisuudet eivät sovellu kalaöljypohjaisten geelien sakeuttamiseen, koska kalaöljyjen toimiessa valmisteissa geelipohjien lisäksi myös aktiivisina komponentteina, tulee kalaöljyjen pitoisuuksien maksimoimiseksi sakeuttamisaineiden osalta käyttää mahdollisimman matalia pitoisuuksia. Sorbitaanitristearaattia sisältävien lesitiiniorganogeelien sakeuttamiseen tarvitaan  $\alpha$ -tokoferolia sisältäviin organogeeleihin nähden huomattavasti matalampia, vain 4 % sorbitaanitristearaattipitoisuuksia (Pernetti ym. 2007). Sorbitaanitristearaatti-lesitiiniorganogeelien matala kriittinen muodostumislämpötila, 20 °C, on kuitenkin auttamatta liian alhainen lopputuotteiden huoneenlämpötilasäilytyksen mahdollistamiseksi.

Kuvassa 4 on esitetty lesitiiniä sisältävien organogeelien viskositeetti polaaristen liuottimien osuuksien funktiona. Lesitiiniorganogeelien muodostumisen on polaaristen liuottimien lisäysten yhteydessä havaittu tapahtuvan aina samalla mekanismilla

(Shchipunov ja Shumilina 1995). Kun käänteisiä misellirakenteita sisältäviin lesitiiniliuoksiin lisätään kriittinen määrä polaarista liuotinta, nousee seosten viskositeetti organogeelien muodostumisen yhteydessä nopeasti ja jyrkästi. Kun polaarista liuotinta tämän jälkeen lisätään seokseen ylimäärin, putoaa viskositeetti kuitenkin nopeasti, kun homogeeninen geeli erottuu jäljellä jäävästä matalaviskoosisesta nesteestä. Vielä tätä suuremmilla polaaristen liuottimien konsentraatioilla erottuneiden geelien on havaittu edelleen jähmettyvän muodostaen säilytysastioiden pohjalle läpinäkymättömiä kiinteitä sakkoja.



Kuva 4. Lesitiiniorganogeelien leikkausviskositeettien muutokset polaarisen liuottimen osuuden kasvaessa (muokattu Vintiliu ja Leroux 2008).

Lesitiiniorganogeelien on havaittu olevan isotrooppisia, viskoelastisia ja termodynaamisesti stabiileja, lämpöpalautuvia systeemejä, joiden tiedetään muuttuvan nestemäisiksi yli 40 °C lämpötiloissa (Willmann ym. 1992; Kumar ja Katare 2005). Lesitiiniä on onnistuneesti käytetty organogelaattorina useissa topikaaliseen annosteluun tarkoitetuissa farmaseuttisissa organogeeleissä (Kumar ja Katare 2005). Lääkeaineista ainakin digoksiini, ketamiini, skopolamiini, nifedipiini, klonidiini sekä jotkin NSAID-lääkeaineet on tutkimuksissa onnistuneesti yhdistetty lesitiinin kanssa erilaisissa organogeeliformulaatioissa (Kumar ja Katare 2005). Joidenkin tutkimusten



mukaan lesitiinien on organogeeleissä havaittu edistävän sekä ravintoaineiden että joidenkin lääkeaineiden imeytymistä (Kumar ja Katare 2005; Langford 2011).

### 5.3 Lesitiini ja piidioksidi sakeuttamisaineina yhdessä

PubMed- ja Scopus-hakutietokannoista sekä Espacenet-patenttitietokannasta tehtyjen hakujen tulosten perusteella lesitiiniä ja kolloidaalista piidioksidia ei tämän työn kirjoitushetkellä saatavilla olevien tietojen perusteella ole tutkittu öljypohjaisten organogeelien sakeuttamisaineina yhdessä muiden tutkijoiden kuin Langfordin osalta (Langford 2011). Langfordin patentissa piidioksidia ja kasviperäistä lesitiiniä käytettiin yhdessä kalaöljypohjaisten organogeelien sakeuttamisessa. Patentin tietojen perusteella yhdistelmävalmisteiden suositeltavaksi piidioksidin pitoisuusväliksi määriteltiin 5–15 % (m/m) ja lesitiinin pitoisuusväliksi 0,1–5 % (m/m). Edellä määritettyjen pitoisuusvälien lisäksi Langford kuvaa patentissaan myös tilannetta, jossa kalaöljypohjaisiin formulaatioihin on kasvipohjaisten sakeuttamisaineiden lisäksi lisätty kolloidaalisen piidioksidin osalta kahta eri laatua; saostettua ja höyrystettyä piidioksidia. Saostetun piidioksidin pitoisuutena edellä kuvatuissa tilanteissa on käytetty yllä piidioksidille esitettyjä pitoisuusvälejä, kun taas höyrystetyn piidioksidin osalta pitoisuus on haettu väliltä 0,1–15 % (m/m) kuitenkin niin, että suositeltavaksi pitoisuusväliksi on määritetty 0,1–5 % (m/m). Kun Langfordin patentissa nestemäisiin kalaöljyihin lisättiin 9 % (m/m) saostettua piidioksidia, 0,9 % höyrystettyä piidioksidia sekä 0,9 % kuivattua soijalesitiiniä, havaittiin lopputuotteiden viskositeettien vaihtelevan viskosimetrin kierrosnopeudesta riippuen välillä 129 000–239 000 cP. Patentin tietojen mukaan piidioksidilla sakeutettujen kalaöljyjen viskositeetti kasvoi 30 %:lla, kun seoksiin lisättiin piidioksidin lisäksi 0,9 % (m/m) kasviperäistä sakeuttamisainetta. Patentin sovellutuspuolella puolestaan havaittiin, että käyttämällä 9,5 % (m/m) kolloidaalista piidioksidia ja 0,9 % (m/m) kasviperäistä sakeuttamisainetta saatiin seoksista aikaan lopputuotteita, jotka muistuttivat koostumuksiltaan lotionia. Kun kolloidaalisen piidioksidin konsentraatiota lopputuotteissa edelleen kasvatettiin 13 %:iin (m/m) asti, havaittiin seosten puolestaan olevan koostumuksiltaan jo selkeästi rasvamaisia.

Geelisovellusten ulkopuolella lesitiiniä ja kolloidaalista piidioksidia on onnistuneesti käytetty sakeuttamisaineina yhdessä ainakin muutamissa erilaisissa emulsio- ja mikrokapselipohjaisissa systeemeissä (Ghouchi Eskander ym. 2007; Tan ym. 2009; Ghouchi Eskander ym. 2011). Tan (2009) tutkimusryhmineen yhdistivät mikrokapselisysteemejä käsittelevässä tutkimuksessaan lipidien solubilisoivan ja silikapartikkelien stabilisoivan vaikutuksen onnistuneesti uudenlaisten silika-lipidi-hybridi-mikrokapselisysteemien kehittämiseksi. Soijalesitiini toimi systeemeissä emulgoivana aineena ja muodostunutta emulsiotilaa stabiloitiin edelleen hydrofiilisillä silikananopartikkeleilla. Silika-lipidi-hybridimikrokapselien avulla havaittiin tutkimuksen perusteella olevan mahdollista parantaa ainakin BCS II luokan lääkeaineiden dissoluutiota ja farmakokineettisiä ominaisuuksia.

Mikrokapseleiden lisäksi soijalesitiiniä on onnistuneesti käytetty yhdessä piidioksidin kanssa myös erilaisissa makroemulsiopohjaisissa systeemeissä (Ghouchi Eskander ym. 2007, Ghouchi Eskander ym. 2011). Kun ö/v-emulsioita samanaikaisesti stabiloitiin hydrofiilisillä silikananopartikkeleilla ja tavanomaisilla pinta-aktiivisilla aineilla, kuten lesitiineillä, havaittiin emulsioiden olevan stabiilimpia sekä sedimentoituvan hitaammin kuin tapauksissa, joissa emulsioiden stabilointi tapahtui pelkällä lesitiinillä (Ghouchi Eskander ym. 2011). Silikananopartikkelien ja pinta-aktiivisten lesitiinien synerginen vaikutus emulsioiden muodostumisessa ja stabiloinnissa havaittiin kuitenkin vain tapauksissa, joissa silikananopartikkelit lisättiin alun perin emulsioiden vesifaasin sijasta emulsioiden öljyfaasiin (Ghouchi Eskander ym. 2007).

## 6. ORGANOGEELIEN VALMISTUS

Kuten luvussa 3.1 on kuvattu, valmistetaan organogeelit organogelaattorien luonteesta riippuen pääsääntöisesti kahdella erilaisella menetelmällä. Toisessa menetelmässä pienimolekyyllipainoiset tai polymeeriset organogelaattorit lisätään lämmitettyyn orgaaniseen liuottimeen, joka geeliytymisen käynnistämiseksi jäähdytetään valmistusprosessin loppupuolella huoneenlämpöiseksi. Toisessa menetelmässä ei tarvita lämpöä, vaan orgaanisten liuottimien ja pinta-aktiivisten organogelaattorien

huoneenlämpöisiin seoksiin lisätään geeliytymisen käynnistämiseksi pieni määrä polaarista liuotinta. Tässä työssä organogeelinäytteiden valmistus oli tarkoitus toteuttaa huoneenlämpöisissä olosuhteissa, käyttäen prosessoinnissa minimiprosessointia ja sakeuttavien aineiden pitoisuuksina mahdollisimman matalia pitoisuuksia. Tässä kappaleessa onkin tämän vuoksi pyritty kirjallisuuden perusteella tarkastelemaan työssä käytettyjen sakeuttavien aineiden laatuja ja määriä erilaisissa organogeeliformulaatioissa. Laatuja ja määrien lisäksi huomioita on kiinnitetty myös organogeelien erilaisiin mahdollisiin valmistusmenetelmiin.

Piidioksidin ja lesitiinin yhdistävässä Langfordin (2011) patentissa kalaöljyjen sakeuttamisessa on piidioksidin lisäksi käytetty apuna kasviperäisiä orgaanisia yhdisteitä kuten perunatärkkelystä, soijalesitiiniä tai soijavahoja. Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella tiedetään, ettei Langfordin menetelmä ole puolikiinteiden, kalaöljypohjaisten, piidioksidilla sakeutettujen organogeelien valmistuksessa täysin ongelmaton (Griinari M, julkaisematon havainto 2013). Stabiilisuuteen liittyvien hapettumisongelmien lisäksi ongelmia saattaa esiintyä myös halutun konsistenssin tai viskositeetin saavuttamisessa, etenkin formulaatioissa, joissa lopputuotteisiin lisätään valmistusprosessin loppupuolella mukaan kiinteitä, liukenemattomia lääkeaineita. Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella Langfordin (2011) patentin mukaisella menetelmällä valmistetuissa organogeeleissa on lisäksi havaittu ongelmia organogeelien nestemäisten öljyfaasien erottumisessa (Griinari M, julkaisematon havainto 2013). Erottumisen lisäksi myös valmistusprosessin sekoittamisolosuhteiden pienten vaihteluiden on havaittu aiheuttavan eroja lopputuotteiden konsistensseissa.

Sekoittamisolosuhteiden herkkyyden ja säilytyksen aikaisen stabiilisuuden lisäksi Langfordin (2011) patentin mukaisen menetelmän heikkoutena ovat organogeelien valmistuksessa tarvittavat korkeahkot piidioksidipitoisuudet. Korkeat piidioksidipitoisuudet saavat tyypillisesti aikaan lopputuotteita, joilla on epämiellyttävä, karkea tai hieman natiseva suutuntuma, mikä saattaa merkittävästi heikentää valmisteiden hoitomyöntyvyyttä. Tässä työssä organogeelinäytteiden valmistuksessa käytettävä piidioksidipitoisuus pyritään valmisteiden maistuvuuden ja

hoitomyöntyvyyden maksimoimiseksi kuitenkin optimoimaan mahdollisimman alhaiselle tasolle.

## 6.1 Sakeuttamisaineiden määrät ja laadut

Alla on tarkasteltu erilaisissa organogeeliformulaatioissa käytettyjä piidioksidi- ja lesitiinilaatuja ja -pitoisuuksia erillisissä luvuissa.

### 6.1.1 Piidioksidi

Langfordin (2011) patentin tutkimuksissa piidioksidia on organogeelien sakeuttamisessa käytetty yksinään 0,5–20 % (m/m) pitoisuuksilla. Suositeltavan pitoisuusvälin havaittiin tutkimusten perusteella asettautuvan 5–15 % (m/m) välille, kun kalaöljyjen sakeuttamisessa käytettiin saostettua piidioksidia, höyrystettyä piidioksidia tai näiden piidioksidilaatujen erilaisia seoksia. Langfordin patentin tutkimuksissa käytettyjen piidioksidimäärien vaikutusta lopputuotteiden viskositeettiarvoihin on kuvattu taulukossa 4. Taulukon tietojen perusteella sekä piidioksidipitoisuus että sekoituksen voimakkuus vaikuttivat lopputuotteiden viskositeettiarvoihin keskeisesti, suurempien piidioksidipitoisuuksien ja korkeaenergisten sekoitustapojen kasvattaessa valmisteiden viskositeetteja. Lisäksi taulukon tuloksista on havaittavissa kiinteiden, öljyyn liukenemattomien aktiiviaineiden pienentävän piidioksidiorganogeelien viskositeettia verrattuna geeliformulaatioihin, joihin ei piidioksidin lisäksi ole lisätty kiinteitä aktiiviaineita.

Taulukko 4. Piidioksidipitoisuuksien vaikutus lopputuotteiden viskositeettiarvoihin, kun  $T = 19\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Langford 2011). Taulukossa ilmoitetut prosenttiosuudet ilmaisevat lisättyjen yhdisteiden pitoisuutta organogeeliformulaatioiden nestemäisten öljyfaasien pitoisuuteen suhteutettuna.

Saostettu piidioksidi	Höyrystetty piidioksidi	Kiinteät aktiiviaineet	Viskositeetti (cP)
0,5 %	-	-	90
2 %	-	-	1 630
2 %	-	13,75 %	1 540
5 % (sekoitus käsin)	-	-	3 740
5 % (sekoitus matala-energisellä sekoittimella)	-	-	4 860
5 % (sekoitus korkea-energisellä sekoittimella)	-	-	9 760
12 %	1 %	-	liian suuri, mittaaminen ei mahdollista
10 %	1 %	-	208 000
9 %	0.5 %	-	204 000

Piidioksidia on Langfordin (2011) patentin lisäksi käytetty organogelaattorina yksinään myös muutamissa muissa viime vuosina julkaistuissa tutkimusformulaatioissa. Goupale ja Rajkapoor (2011) käyttivät geelipohjana seesamiöljyä tai nestemäistä parafiiniä sisältävien organogeelien sakeuttamisessa piidioksidin osalta 7,0 % (m/m) ja 7,5 % (m/m) pitoisuuksia, kun taas Nippe ja General (2014) hyödynsivät MCT-öljypohjaisessa organogeelissä huomattavasti pienempää, vain 3,0 % (m/m) piidioksidipitoisuutta. Yleisenä ohjeena Balasubramanian (2012) tutkimusryhmineen toteaa, että piidioksidin on 5–10 % pitoisuuksilla havaittu muodostavan pastojen kaltaisia lopputuotteita ainakin isopropyylimyristaattia ja maapähkinäöljyä sisältävissä formulaatioissa.

Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee nestemäisten seosten sakeuttamisessa käytettävän lähtöpisteenä joissakin tapauksissa jopa alle 1 % piidioksidipitoisuuksia (Aerosil Technical Information No. 1279). Toisaalta toisessa teknisessä dokumentaatioissaan valmistaja suosittaa piidioksidin aloituspitoisuutena käytettävän 3 % (m/m) pitoisuutta, mutta kuvaa pitoisuutta voivan tämän jälkeen edelleen joko kasvattaa tai pienentää halutun viskositeettitason saavuttamiseksi (Aerosil Technical Information No. 1281). Valmistajan mukaan Aerosilia® sideaineena tai erilaisissa kosmeettisissa valmisteissa käytettäessä, saatetaan lopputuotteiden tavanomaista

korkeamman viskositeettitavoitteen vuoksi tarvita kuitenkin edellä esitettyjä piidioksidipitoisuuksia korkeampia, jopa 4–8 % (m/m), piidioksidipitoisuuksia (Aerosil Technical Information No. 1279). Tarvittava piidioksidipitoisuus riippuu paitsi nestemäisen faasin alkuperäisestä viskositeetista ja halutusta tavoitetasosta, myös tavoitellun säilyvyys- ja stabiilisuusajan pituudesta.

Ei-polaaristen liuottimien sakeuttamiseen Evonik suosittelee Aerosil®-laaduista ensisijaisesti Aerosil® 300 Pharmaa, mutta kuvaa myös Aerosil® 200 Pharman soveltuvan (Aerosil Technical Information No. 1281). Aerosil® 300 Pharma eroaa tunnetuimmasta Aerosil® 200 Pharmasta spesifisen pinta-alansa koon suhteen, joka Aerosil® 300 Pharman osalta on nimensä mukaisesti 300 m<sup>2</sup>/g, kun taas Aerosil® 200 Pharman spesifinen pinta-ala on Aerosil® 300 Pharmaa pienempi, vain 200 m<sup>2</sup>/g.

#### 6.1.2 Lesitiini

Scartazzini ja Luisi (1988) havaitsivat lesitiiniorganogeelejä käsittelevässä tutkimuksessaan orgaanisten liuottimien osuutta olevan lesitiiniorganogeeleissä mahdollista kasvattaa aina 80 % asti niin, että seoksia oli edelleen mahdollista sakeuttaa geelimäisiksi. Tällaisissa tapauksissa tarvittavan lesitiinin pitoisuuden havaittiin olevan noin 10 % (m/m). Erilaisissa organogeeliformulaatioissa käytettyjä lesitiinipitoisuuksia on kuvattu taulukossa 5. Koska tässä työssä organogeeleinäytteiden sakeuttamisessa on lesitiinin ohella kuitenkin käytetty myös kolloidaalista piidioksidia, on todennäköistä, että työssä tarvittavat lesitiinipitoisuudet jäävät todellisuudessa lesitiiniä yksin geelinmuodostajana käytettäessä tarvittavia lesitiinipitoisuuksia pienemmiksi.

Taulukko 5. Lesitiinien ja polaaristen liuottimien pitoisuuksia erilaisissa organogeeliformulaatioissa.

<b>Tutkimus</b>	<b>Lesitiinin pitoisuus</b>	<b>Polaarisen liuottimen pitoisuus suhteessa lesitiinin pitoisuuteen</b>	<b>Muuta huomioitavaa</b>
Scartazzini ja Luisi 1988	50–200 mM	Välillä 1–12 orgaanisesta liuottimesta riippuen	Useita orgaanisia liuottimia
Willard ym. 1998	5 % (m/V)	3,8	Orgaanisena liuottimena sykloheksaani
Willmann ym. 1992	120–200 mM	Isopropyylipalmitaatti-organogeeleissä 3  Syklo-oktaani-organogeeleissä 12	Dynaaminen viskositeetti (25 °C, 0.5 rad/s) isopropyylipalmitaatti-geelille 170 P ja syklo-oktaanigeelille 3260 P
Pernetti ym. 2007	Sakeuttavien aineiden kokonaismäärä 6 %, 8 % tai 12 % (m/m), lesitiinin osuus tästä 0–100 %	-	Lesitiinin ohella sakeuttavana aineena sorbitaanitristearaatti
Angelico ym. 2005	5 ja 15 %	Isopropyylipalmitaatti-geeleissä 0–5.4 Etyylioleaattigeeleissä 1.8–6.8	-
Shaikh ym. 2009	22,8 % (m/V)	4	Orgaanisena liuottimena etyylioleaatti
Parsae ym. 2002	0,25 % (munalesitiini)	Isopropyylimyristaatin ja propyleeniglykolin suhde 2,5 : 20 (V/m)	Orgaanisena liuottimena isopropyylimyristaatti

Lesitiinien ja polaaristen liuottimien välisenä suhteena lesitiiniorganogeeleissä on tavanomaisesti käytetty suhdetta 1:5, kuitenkin niin, että orgaanisten liuottimien luonteesta riippuen suhde on saattanut myös hieman vaihdella (Murdan 2005). Kuten luvussa 5.2.2 on kuvattu, tiedetään polaaristen liuottimien pitoisuuksien vaikuttavan lesitiiniorganogeelien muodostumiseen ja viskositeettiin keskeisesti (Shchipunov ja Shumilina 1995). Koska tässä työssä organogeeleinäytteiden sakeuttamisessa ei käytetä polaarisia liuottimia vaan lesitiinien ja piidioksidien seoksia, ei edellä esitettyä lesitiinien ja polaaristen liuottimien välistä suhdetta voida välttämättä pitää tämän työn

kannalta merkityksellisenä. Koska piidioksidin on polaaristen liuottimien tavoin havaittu kuitenkin kykenevän vetysidosten muodostukseen, on mahdollista, että edellä esitetty lesitiinin ja polaarisen liuottimen välinen suhde voisi toimia lähtökohtana myös piidioksidin ja lesitiinin väliselle suhteelle.

Sitä, vaikuttaako lesitiinin lähde organogeelien muodostumiseen, ei vielä tiedetä varmasti. Luonnosta peräisin olevista tyydyttymättömistä lesitiineistä ainakin soijalesitiinin ja munalesitiinin on orgaanisissa liuottimissa havaittu muodostavan geelejä toivotusti (Kumar ja Katare 2005). Pernetti (2007) tutkimusryhmineen havaitsivat lisäksi auringonkukkaöljyjen sakeutuvan geelimäisiksi seoksiksi, kun auringonkukkaöljyihin lisättiin auringonkukasta peräisin olevien lesitiinien lisäksi sorbitaanitristearaattia. Synteettisten lesitiinien ei luonnosta peräisin olevien lesitiinien tavoin ole kuitenkaan havaittu muodostavan geelejä orgaanisissa liuottimissa toivotusti (Shchipunov 2001). Synteettisten lesitiinien tavoin myöskään hydratun soijalesitiinin ei orgaanisissa liuottimissa havaittu kykenevän geelien muodostukseen odotetusti, mistä johtuen luonnosta peräisin olevien lesitiinien tyydyttymättömien rasvahappojen on arvioitu olevan geelien muodostamiskyvyn kannalta merkityksellisiä. Scartazzini ja Luisi (1988) ovat lisäksi havainneet orgaanisten liuottimien geeliytyvän vain tilanteissa, joissa lesitiini on puhdistettu sisältämään vähintään 95 % fosfatidyylikoliinia. Puhdistamattomien lesitiinien ei Scartazzinin ja Luisin tutkimuksissa havaittu kykenevän geelien muodostukseen minkäänlaisissa olosuhteissa.

## 6.2 Organogeelien valmistusprosessit

Pienimolekyylipainoisia organogelaattoreja sisältävien organogeelien valmistus suoritetaan tavallisesti huoneenlämpötilaa korkeammissa lämpötiloissa (Vintiloju ja Leroux 2008). Kalaöljyjen ja useiden muidenkin öljylaatujen on kuitenkin havaittu olevan herkkiä lämmön vaikutuksille ja tyydyttymättöminä öljyinä kalaöljyjen onkin havaittu hapettuvan lämmölle altistumisen seurauksena herkästi (Stansby 1967). Lämmön vaikutusta organogeelien mekaanisiin ominaisuuksiin ja ulkonäköön on kuvattu etyylielluloosaoleogeelejä käsittelevässä julkaisussa (Gravelle ym. 2012). Etyylielluloosaa sisältävien organogeelien hapettumisen havaittiin tutkimuksessa



lisääntyvän merkittävästi, kun seoksia lämmitettiin 140 °C lämpötilassa yli 20 minuutin ajan. Hapettumisen havaittiin johtavan paitsi geelien mekaanisten ominaisuuksien heikentymiseen myös geelien värjäytymiseen. Öljyjen hapettumisen lisäksi organogeelien valmistusprosesseissa käytetyt korkeat lämpötilat saattavat vaikuttaa myös pinta-aktiivisten aineiden tai itse organogelaattorien stabiilisuuteen heikentävästi. Pinta-aktiivisten aineiden tai organogelaattorien hajoaminen saattaa edelleen johtaa ongelmiin geelien laadun, maistuvuuden, koostumuksen tai säilyvyyden kannalta. Lisäksi on havaittu, että lämmön epätasainen jakautuminen valmistuksen aikana sekä mahdollinen lämmitysaikojen vaihtelu johtaa tyypillisesti geelien mekaanisten ominaisuuksien huomattavaan vaihteluun ja tämän seurauksena epätasalaatuisten organogeelien muodostumiseen. Minimiprosessoinnin ja mahdollisimman vähäisen lämmönkäytön on kalaöljyjen kohdalla arvioitu parantavan sekä kalaöljyjen stabiilisuutta että pidentävän niiden säilyvyyttä.

#### 6.2.1 Piidioksidi

Aerosilin® valmistajalta saatujen tietojen mukaan piidioksidipohjaisten organogeelien valmistuksessa tulee Aerosilin® tehon maksimoimiseksi ja asianmukaisen toimintakyvyn varmistamiseksi käyttää korkeilla leikkausnopeuksilla suoritettua voimakasta dispergointia (Aerosil Technical Information No. 1279). Valmistajan mukaan matalilla leikkausnopeuksilla suoritettu dispergointi (*low shear dispersion*) ei yleisesti ottaen ole riittävää, vaan johtaa paitsi vaihteleviin sakeutumisasteisiin erien välillä myös kiinteiden lääkeaineiden sedimentoitumiseen ja huonoon stabiliteettiin säilytyksen aikana. Matalilla leikkausnopeuksilla tapahtuvan dispergoinnin sijaan valmistaja suosittelee piidioksidipohjaisten seosten dispergoinnissa aggressiivista, sahalaitaisilla terillä ja korkeilla leikkausnopeuksilla suoritettavaa dispergointia (*high shear dispersion*), jossa valmistajan tuotannon sovelluksiin suosittelemat terien ratanopeudet ovat jopa 8–10 m/s. Dispergoinnin sijaan piidioksidin kostutus ennen varsinaisen dispergoinnin aloittamista voidaan valmistajalta saatujen tietojen mukaan kuitenkin suorittaa myös matalilla leikkausnopeuksilla.

Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee organogeelien valmistuksessa korkeilla leikkausnopeuksilla tapahtuvan dispergoinnin lisäksi myös mahdollisimman lyhyiden dispergointiaikojen käyttöä (Aerosil Technical Information No. 1279). Lämpötilan nousu pitkän dispergoinnin seurauksena saattaa johtaa ongelmiin systeemien viskositeettien pienenemisen kanssa. On kuitenkin havaittu, että mikäli dispergoinnissa käytetään riittävän suuria leikkausnopeuksia, ei prosessointiaika ole valmisteiden koostumuksen kannalta yhtä kriittinen kuin matalia leikkausnopeuksia käytettäessä. Valmistajan suositusten mukaan Aerosil® tulisi lisätä orgaanisten liuottimien sekaan mahdollisen varhaisessa prosessivaiheessa. Höyrystettyä Aerosilia® ei ole tarpeen esidispergoida liuottimien kanssa, vaan kostutus suositellaan tehtäväksi mahdollisimman pienellä liuotinmäärällä. Mahdolliset muut formulaatioon lisättävät yhdisteet tulisi valmistajan suositusten mukaan lisätä prosessiin vasta piidioksidin kostutusvaiheen päätyttyä.

Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee kolloidaalista piidioksidia sisältävien oleogeelien valmistuksessa kolloidaalisen piidioksidin kostutusta öljyllä noin 2–3 minuutin ajan ja tämän jälkeen voimakasta dispergointia *high shear*-sekoittimella noin 10–15 minuutin ajan (Lortz sähköpostiviesti 2011). Koska valmistus näin toteutettuna on kalaöljyille kuitenkin suhteellisen rankka prosessointi ja saattaa aiheuttaa ongelmia kalaöljyjen stabiilisuuksien kanssa, on tämän työn tavoitteena käyttää organogeelinäytteiden valmistuksessa mahdollisimman hellävaraisia sekoituselementtejä ja sekoitusolosuhteita.

Langfordin (2011) patentissa kalaöljyä ja piidioksidia sisältäviä organogeellejä valmistettiin dispergoimalla jauhemaisessa muodossa oleva piidioksidi kalaöljyn sekaan kalaöljyä jatkuvasti sekoittaen. Sekoitusta jatkettiin lisäysten jälkeen niin pitkään, kunnes haluttu viskositeettiaste saavutettiin. Piidioksidin lisäys öljyfaasiin on Langfordin mukaan mahdollista toteuttaa erilaisilla menetelmillä kuten injektoimalla, vakuumin avulla tai esisekoittamalla piidioksidi kalaöljyn sekaan *high shear*-sekoittimen tai homogenisaattorin avulla. Organogeelit voidaan Langfordin mukaan valmistaa myös kokonaisuudessaan vakuuimissa, mikäli valmisteen altistumista hapelle halutaan minimoida.

Goupale ja Rajkapoor (2011) käyttivät geelipohjina seesamiöljyä ja nestemäistä parafiinia sisältävien, piidioksidilla sakeutettujen organogeelien valmistuksessa Langfordin (2011) tavoin sekoitusmenetelmää ilman lämmityskomponenttia. Geelien viskositeettia kasvatettiin tutkimuksessa halutulle tasolle lisäämällä tarvittava määrä kolloidaalista piidioksidia geelipohjaisiin seoksiin 50 rpm sekoitusnopeudella (Goupale ja Rajkapoor 2011). Nippe ja General (2014) puolestaan valmistivat piidioksidilla sakeutettuja organogeelejä sonikoimalla geelipohjana käytettyyn lämmitettyyn MCT-öljyyn piidioksidia 5 x 10 % sykleissä, 100 % teholla, käyttäen sonikointiaikoina 3–5 minuutin pituisia sonikointiaikoja. Haluttu geeli muodostui tämän jälkeen liuksen jäähtyttyä. Vaikka valmistusprosessissa käytettiin lämpöä, ei lämmittämisen kuitenkaan piidioksidin tapauksessa havaittu olevan geelien muodostumisen kannalta välttämätöntä.

#### 6.2.2 Lesitiini

Lesitiiniä sisältävien organogeelien valmistus on Langfordin (2011) mukaan mahdollista toteuttaa samankaltaisilla menetelmillä, kuten edellä piidioksidin kohdalla on kuvattu. Piidioksidia sisältäviin organogeeleihin verrattuna lesitiinipohjaisten organogeelien valmistusprosessien erona on kuitenkin se, että lesitiiniä ja orgaanisia liuottimia sisältäviin seoksiin joudutaan usein valmistusprosessin loppupuolella lisäämään geelitymisen käynnistämiseksi pieniä määriä polaarisia liuottimia. Kolloidaalisen piidioksidin lisäksi myös lesitiiniä sisältävien organogeelien valmistus on hapettumisen minimoimiseksi mahdollista toteuttaa hapettomissa olosuhteissa vakuumissa. Mikäli lesitiinillä sakeutettuihin organogeeleihin halutaan lisätä kiinteitä lääkeaineita, voidaan ne kiinteiden lääkeaineiden luonteesta riippuen joko liuottaa orgaanisten liuottimien ja lesitiinien seoksiin tai lisätä sekaan vasta myöhemmässä valmistusvaiheessa yhdessä polaaristen liuottimien kanssa (Murdan 2005).

Lesitiiniorganogeelit valmistetaan tyypillisesti huoneenlämpötilassa, kahdessa valmistusvaiheessa, liuottamalla lesitiini orgaanisen liuottimen sekaan ennen polaaristen liuottimien lisäämistä (Scartazzini ja Luisi 1988; Willmann ym. 1992). Polaaristen liuottimien lisäysten jälkeen lesitiiniorganogeelien on tyypillisesti havaittu

muodostuvan noin 30 sekunnin kuluessa, mutta usein geelien annetaan kuitenkin tasaantua muutamien päivien ajan ennen niiden lopullisten ominaisuuksien tarkastelua. Edellä esitetystä valmistustavasta poiketen Willard (1998) tutkimusryhmineen valmistivat lesitiiniä sisältäviä organogeelejä useammassa kuin kahdessa valmistusvaiheessa. Ensimmäisessä valmistusvaiheessa tutkijat liuottivat lesitiinin orgaaniseen liuottimeen ja lisäsivät näin saatuun seokseen pienen määrän polaarisen liuottimen asemassa toimivaa vettä. Tämän jälkeen organogeeleihin lisättiin kiinteitä lääkeaineita ja niitä sonikoitiin lyhyesti, jonka jälkeen näytteitä sekoitettiin yhtäjaksoisesti vähintään 12 tunnin ajan. Sekoituksen jälkeen näytteet lämmitettiin noin 35 °C:seen, suodatettiin ruiskusuodattimien läpi ja niihin lisättiin geelien valmistuksessa tarvittava lopullinen vesimäärä. Veden lisäyksen jälkeen näytteitä sekoitettiin vielä vähintään 12 tunnin ajan ennen niiden lopullisten ominaisuuksien tarkastelua. Myös Angelico (2005) tutkimusryhmineen valmistivat lesitiiniorganogeelejä tavanomaisesta valmistustavasta poiketen punnitsemalla asianmukaiset määrät lesitiiniä sekä orgaanisia ja polaarisia liuottimia pieniin lasiputkiloihin. Viskositeetista riippuen näytteitä sekoitettiin lasiputkiloissa joko ravistelemalla tai sentrifugoimalla säännöllisin väliajoin jopa kahden viikon ajan ennen vesihauteeseen siirtämistä. Valmistuksen jälkeen näytteiden annettiin seistä 25 °C vesihauteessa vielä viikon ajan ennen niiden lopullisten ominaisuuksien tarkastelua.

Tässä luvussa on tarkastelu tässä työssä sakeuttamisaineina käytettyjen piidioksidin ja lesitiinin pitoisuuksia ja valmistusprosesseja käsittelevää kirjallisuutta yksityiskohtaisesti. Koska tässä työssä käytettyjä sakeuttamisaineita ei kuitenkaan ole aikaisemmin käytetty yhdessä kalaöljypohjaisten seosten sakeuttamisessa muiden tutkijoiden kuin Langfordin (2011) osalta, eivät tässä luvussa esitetyt tiedot sakeuttamisaineiden pitoisuuksista ja valmistusprosesseista välttämättä sovellu työssä sellaisenaan käytettäväksi. Tästä syystä tämän työn tarkoituksena on ennen varsinaisten organogeeelinäytteiden valmistusta pyrkiä esikokeiden avulla selvittämään työn tavoitteiden saavuttamisen kannalta oleellisten parametrien vaikutusta organogeeelinäytteiden muodostumisessa.

## 7. TYÖN TARKOITUS

Tämän työn tarkoituksena on kehittää ja optimoida lemmikkieläimille tarkoitettua, suun kautta annosteltavan organogeelipohjaisen ravintotuotteen koostumus ja valmistusprosessi. Tuotekehitystavoitteen lisäksi työn tarkoituksena on tutkia ja ymmärtää erilaisten pinta-aktiivisten aineiden vaikutusta kalaöljypohjaisten organogeelien sakeutumisessa. Kalaöljyt sakeutetaan työssä kolloidaalisella piidioksidilla, mutta kolloidaalisen piidioksidin lisäksi osaan formulaatioista lisätään piidioksidin geelinmuodostusta tehostaviksi komponenteiksi myös pinta-aktiivisia aineita. Kolloidaalisen piidioksidin ja pinta-aktiivisten aineiden vaikutusta kalaöljyjen sakeutumiseen arvioidaan työssä visuaalisen tarkastelun ja dynaamisella rotaatioreometrillä määritettyjen, viskoelastisuutta kuvaavien parametrien perusteella 1 viikon ja 3 kuukauden kuluttua organogeelien valmistuksesta. Valmistneiden koostumusten etukäteisvaatimusten mukaisesti organogeelien toivotaan muodostavan täysin viskooseja, jopa hieman pastamaisia ja jähmeitä lopputuotteita, joiden stabiilisuuksien toivotaan säilyvän riittävällä tasolla vähintään 2 vuoden ajan organogeelien valmistuksesta. Valmistettujen organogeelinäytteiden kolmiulotteista rakennetta tarkastellaan työssä elektronimikroskoopin avulla. Kolmiulotteisen rakenteen tarkastelun tavoitteena on ymmärtää mahdollisia toimintaperiaatteita pinta-aktiivisten aineiden sakeuttavien ominaisuuksien taustalla.

Aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella kehittämistyön lähtökohdaksi on valittu seos, jossa öljyfaasin ja öljyyn liukenemattomien kiinteiden lääkeaineiden välisenä suhteena toimii suhde 4:1 niin, että sakeuttavien aineiden pitoisuudet sisällytetään seoksen öljyfaasin osuuteen. Optimaalisten sakeuttamisaineiden määrien ja laatuja arvioimisen lisäksi työn tarkoituksena on kehittää työssä valmistettaville organogeelleille soveltuva laboratoriomittakaavainen valmistusprosessi. Valmistusprosessin etukäteisvaatimuksiksi on asetettu minimiprosessointi ja mahdollisimman vähäinen lämmönkäyttö. Lisäksi työn tarkoituksena on esivaatimusten mukaisesti käyttää lopputuotteiden hoitomyyntyvyyden ja maistuvuuden sekä aktiivikomponenttien pitoisuuksien maksimoimiseksi sakeuttavien aineiden osalta mahdollisimman matalia pitoisuuksia.

## 8. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 8.1 Materiaalit

Tässä työssä valmistettuihin, piidioksidilla sakeutettuihin kalaöljypohjaisiin organogeeliformulaatioihin, lisättiin valmistusprosessin loppupuolella mukaan kiinteinä lääkeaineina kondroitiinisulfaattia ja glukosamiinia. Kondroitiinisulfaattia ja glukosamiinia on käytetty yhdessä useissa sekä ihmisten että eläinten nivelten hyvinvointiin tarkoitetuissa ravintolisissä, luontaistuotteissa ja täydennysrehuissa. Glukosamiinin ja kondroitiinisulfaatin yhteiskäyttö on joissakin tutkimuksissa osoitettu tarkoituksenmukaiseksi tiettyjen nivelrikkoa sairastavien potilasryhmien hoidossa (Clegg ym. 2006). Clegg tutkimusryhmineen havaitsivat glukosamiinin ja kondroitiinisulfaatin yhteiskäytöllä olevan positiivisia vaikutuksia eräissä nivelrikkopotilaiden alaryhmissä, mutta vastaavia positiivisia vaikutuksia ei kuitenkaan havaittu kaikilla nivelrikkopotilailla.

Glukosamiinia ja kondroitiinisulfaattia on edellä kuvatun kappaleen mukaisesti käytetty nivelravinteina myös eläimillä. Nivelrikon on havaittu olevan valitettavan yleinen ongelma koirilla ja joidenkin arvioiden mukaan jopa lähes 20 % yli yksivuotiaista koirista kärsisi nivelrikosta (Johnston 1997). Glukosamiinin ja kondroitiinisulfaatin on havaittu helpottavan nivelrikkoa sairastavien koirien liikkumista ja vähentävän niiden kipulääkityksen tarvetta (Griinari 2012). Glukosamiinin ja kondroitiinisulfaatin lisäksi myös tässä työssä geelipohjana käytetyn kalaöljyn positiivinen vaikutus nivelrikkoa sairastavien koirien liikkuvuuteen on havaittu muutamissa viime vuosina julkaistuissa kliinisissä tutkimuksissa (Roush ym. 2010; Moreau ym. 2013; Hielm-Björkman ym. 2012).

#### 8.1.1 Kondroitiinisulfaatti

Kondroitiinisulfaatti kuuluu glykosaminoglykaaneiksi kutsuttuun polysakkaridien ryhmään (Monfort ym. 2008). Se on yksi ruston keskeisimmistä rakennusosista ja muodostaa osan ruston mekaanisten ja elastisten ominaisuuksien kannalta keskeisestä

proteoglykaanista. Kondroitiinisulfaatin terapeuttisten vaikutusten on solutasolla arveltu perustuvan sekä *in vivo* havaittuihin kondroitiinisulfaatin tulehdusta hillitseviin ominaisuuksiin että *in vitro* ja *in vivo* havaittuihin proteoglykaanien ja hyaluronihappojen endogeenisten synteisien stimulaatiovaikutuksiin. Kondroitiinisulfaatin on tutkimuksissa osoitettu imeytyvän suun kautta (Volpi 2002). Tehtyjen tutkimusten perusteella kondroitiinisulfaatin glykosaminoglykaanisynteesiä tehostava vaikutus on kuitenkin epävarma ja eläimillä suoritettujen kokeiden perusteella kondroitiinisulfaatin onkin todennäköisemmin arvioitu toimivan anti-inflammatorisena kuin glykosaminoglykaanisynteesiä tehostavana yhdisteenä (Ronca ym. 1998).

Kondroitiinisulfaatin on joidenkin tutkimusten mukaan havaittu helpottavan nivelrikkoa sairastavien potilaiden oireita, mutta kliinisistä tutkimuksista saadut tulokset ovat kuitenkin pääsääntöisesti olleet ristiriitaisia (Reichenbach ym. 2007). Vaikutuksen on todettu alkavan keskimäärin noin muutaman viikon kuluessa hoidon aloittamisesta. Kondroitiinisulfaattia on nivelrikon lisäksi aikaisemmin käytetty myös ainakin osteoporoosin, iskeemisten sydänsairauksien sekä hyperlipidemioiden hoidossa (Martindale 2002).

Luonnossa esiintyvien kondroitiinisulfaattien on havaittu olevan molekyylikooltaan noin 50–100 kDa, mutta ravintolisinä käytettyjen kondroitiinisulfaattien molekyylikoko kuitenkin vaihtelee (Griinari 2012). Pienimolekyyllipainoisten kondroitiinisulfaattien (13–18 kDa) on koirilla havaittu olevan hyväksikäyttökelpoisuuksiltaan luonnollisia kondroitiinisulfaatteja parempia, minkä vuoksi eläinlääkinnässä pyritäänkin tyypillisesti suosimaan pienimolekyyllipainoisten kondroitiinisulfaattien käyttöä (Adebawale ym. 2002). Tässä työssä kondroitiinisulfaattina on käytetty molekyylikooltaan 11–18 kDa kondroitiinisulfaattia (Chondroitin sulf sodium 100, oral grade, erä 17 02 14 03, Bioiberica, Barcelona, Espanja).

### 8.1.2 Glukosamiini

Glukosamiinin N-asetyloitunut muoto on osa nivelruston keratiinisulfaatin ja hyaluronaatin glykosaminoglykaanien rakennetta (Arokoski ym. 2008a).

Glykosaminoglykaanit ovat rakenteeltaan negatiivisesti varautuneita, haarautumattomia, peräkkäisistä disakkaridiyksiköistä muodostuneita polysakkaridiketjuja, joiden disakkaridiyksiköiden uronihappoon on liittynään joko glukosamiini tai galaktosamiini. Elimistön solut eivät kykene käyttämään glukosamiinivalmisteiden sisältämää glukosamiinia nivelruston rakennuskomponentteina sellaisenaan, vaan glukosamiinien on ennen niiden hyödyntämistä aktivoiduttava soluissa UDP-nukleotidien liittämisen seurauksena. UDP-sokeripitoisuuksien on rustosoluissa kuitenkin havaittu muuttuvan vasta melko korkeilla glukosamiinipitoisuuksilla.

Glukosamiinin on meta-analyysien perusteella havaittu todennäköisesti olevan lumelääkettä tehokkaampi nivelrikon aiheuttaman kivun ja heikentyneen toimintakyvyn hoidossa, mutta useat aiheesta käsittelevät kliiniset tutkimukset esittävät glukosamiinin tehosta kuitenkin ristiriitaisia tuloksia (Arokoski ym. 2008a). Mahdollisia vaikutusmekanismeja glukosamiinin tehon taustalla ovat sen kyky lisätä nivelruston proteoglykaanisynteesiä sekä kyky estää proteoglykaania pilkkovien entsyymien kuten aggregaasien ja metalloproteiinaasien toimintaa ja synteesiä. Glukosamiinin on lisäksi joissakin tutkimuksissa havaittu estävän tulehdusvälittäjäaineista ainakin IL-1:n, typpioksidin ja prostaglandiinien tuotantoa (Arokoski ym. 2008b). On kuitenkin arvioitu, että suun kautta annostellun glukosamiinin aikaansaama pitoisuus nivelnesteessä ei välttämättä olisi glukosamiinin positiivisten vaikutusten kannalta riittävä. Lisäksi yhteyttä proteoglykaanien ja tulehduksesta aiheutuvien synteettien pidetään kyseenalaisena. Työssä käytetty glukosamiini on hankittu työtä varten kondroitiinisulfaatin kanssa samalta valmistajalta (Glucosamine hydrochlorid, USP, erä 17 02 14 04, Bioiberica, Barcelona, Espanja).

### 8.1.3 Kalaöljy, piidioksidi ja lesitiini

Kalaöljyn, piidioksidin ja lesitiinin ominaisuuksia on tässä työssä tarkasteltu aiemmin luvuissa 4, 5 ja 6. Työssä käytetyt kalaöljy-, piidioksidi- ja lesitiinilaadut on kuvattu taulukossa 6. Kalaöljy- ja lesitiinilaatua 1–4, piidioksidilaatua Aerosil® 200 VV Pharma on käytetty työssä esikokeissa. Aerosil® 200 VV Pharma lisäksi esikokeissa on testattu optimaalista piidioksidilaatua määritettäessä piidioksidilaatujen



osalta myös laatuja Aerosil® 200 Pharma, Aerosil® 300 Pharma sekä Aerosil® R972 Pharma. Varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistus on suoritettu kalaöljyalaadulla 4. Piidioksidin osalta varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa on esikokeiden ja kirjallisuudesta saatujen tietojen perusteella käytetty kahta eri piidioksidilaatua; Aerosil® 200:aa ja Aerosil® 300 Pharmaa; sekä lesitiinin osalta yhteensä kuutta erilaista lesitiinilaatua (lesitiinilaadut 1–4 sekä lesitiinilaadut 6–7).

Piidioksidilaaduista Aerosil® 200 VV Pharma poikkeaa tavallisesta Aerosil® 200 Pharmasta suuremman tärytiheydensä perusteella, minkä vuoksi Aerosil® 200 VV Pharmaa suositellaan tyypillisesti kiinteissä lääkeformulaatioissa käytettäväksi (Aerosil Technical Information No. 1281). Tavallisen Aerosil® 200- ja Aerosil® 200 Pharmaalaadun erottavat toisistaan puolestaan materiaalien puhtausaste (Aerosil Technical Information No. 1281). Piidioksidilaaduista poiketen työssä käytetyt lesitiinilaadut eroavat toisistaan sekä öljykomponenttiansa että fosfatidyylikoliinipitoisuuksiensa perusteella. Krilliöljyt sekä Phosal® 35 SB sisältävät molemmat fosfatidyylikoliinia noin 35 %, kun taas Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA sisältävät fosfatidyylikoliinia nimiensä mukaisesti noin 53 % ja 75 %. Muista lesitiinilaaduista poiketen Phosal® 35 SB sisältää kuitenkin fosfatidyylikoliinin lisäksi koostumuksessaan myös fosfatidyylietanolamiinia (4,6 %), fosfaattihappoa (0,5 %) ja monofosfatidyyli-inositolia (< 0,5 %).

Taulukko 6. Työssä käytetyt kalaöljy-, lesitiini- ja piidioksidilaadut.

<b>Työssä käytetty nimi</b>	<b>Raaka-aine</b>	<b>Erä</b>	<b>Laatu</b>	<b>Valmistaja ja valmistuspaikka</b>
Kalaöljy 1	Kalaöljy	PO1119401	HO307-7	LYSI HF, Reykjavik, Islanti
Kalaöljy 2	Kalaöljy + tokoferoli (0,086 %)	PO1119401	HO307-7	LYSI HF, Reykjavik, Islanti
Kalaöljy 3	Kalaöljy	PO3066002	HO307-9	LYSI HF, Reykjavik, Islanti
Kalaöljy 4	Kalaöljy	PO4003505	HO307-9	LYSI HF, Reykjavik, Islanti
Lesitiini 1 (krilliöljy)	Krilliöljy (osanäyte 1)	U270/007/A13	Superba™	Naturex Spain SL, Quart de Poblet, Espanja
Lesitiini 2	Phosal® 35 SB	3130031	Soybean oil	Lipoid Phospholipid GmbH, Köln, Saksa
Lesitiini 3	Phosal® 53 MCT	3140010	MCT oil	Lipoid Phospholipid GmbH, Köln, Saksa
Lesitiini 4	Phosal® 75 SA	3130010	Safflower oil	Lipoid Phospholipid GmbH, Köln, Saksa
Lesitiini 5 (krilliöljy)	Krilliöljy- kapseli	3032	Superba™	Life Europe AB, Tukholma, Ruotsi
Lesitiini 6 (krilliöljy)	Krilliöljy (osanäyte 2)	U270/007/A13	Superba™	Naturex Spain SL, Quart de Poblet, Espanja
Lesitiini 7 (krilliöljy)	Krilliöljy- kapseli	Clinicians V1365	Rimfrost	Extract Solutions, Richmond NZ
A200VV	Aerosil® 200 VV Pharma	3150091414	Fumed Silica	Evonik Industries AG, Hanau, Germany
A200P	Aerosil® 200 Pharma	3152121414	Fumed Silica	Evonik Industries AG, Hanau, Germany
A300	Aerosil® 300 Pharma	153120614/ 153121714	Fumed Silica	Evonik Industries AG, Hanau, Germany
AR972	Aerosil® R972 Pharma	333080211	Fumed Silica	Evonik Industries AG, Hanau, Germany
A200	Aerosil® 200	1152762	Fumed Silica	Orion Pharma, Espoo, Suomi

#### 8.1.4 Tokoferoli

Esikokeiden perusteella tokoferolia sisältävän kalaöljyalaadun 2 havaittiin sakeutuvan geelimäiseksi seokseksi pelkän piidioksidilisäyksen yhteydessä olosuhteissa, joissa piidioksidia ja kalaöljyalaatuja 1 tai 4 sisältäneet seokset eivät geeliytyneet toivotusti. Tämän esikokeissa tehdyn havainnon perusteella työssä päätettiin erilaisten lesitiinilaatujen lisäksi testata piidioksidin geelinmuodostusta tehostavana komponenttina myös tokoferolia (Tocovet® Mixed Tocopherols, 70 % oil, erä F20130130006, Fenchem Biotek LTD, Nanjing, Kiina).

Alfatokoferoli, joka paremmin tunnetaan biologisesti aktiivisena E-vitamiinina, on lipofiilisenä yhdisteenä käytännössä veteen liukenematon, mutta liukenee kuitenkin asetoniin, etanoliin, eetteriin ja kasviöljyihin (Quinn 2009). Tavanomaisesti alfatokoferolia käytetään öljy- tai rasvapohjaisissa valmisteissa antioksidanttina noin 0,001–0,05 % (v/v) pitoisuuksilla. Tokoferolin valintaa yhdeksi piidioksidin geelinmuodostusta tehostavaksi testikomponentiksi tukee sen tämän hetkinen rutiinimainen käyttö kalaöljyjen hapettumisen ehkäisyssä. Tavanomaiset kalaöljyihin lisättävät antioksidanttiset pitoisuudet ovat noin 200–2000 ppm, minkä vuoksi tässä työssä 70 %:sen tokoferoliseoksen osalta on päädytty käyttämään 0,275 % (m/m) optimipitoisuutta.

#### 8.2 Esikokeet

Tässä työssä esikokeiden avulla oli tarkoitus tutkia varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa käytettäviä piidioksidilaatuja, sekoituselementtejä ja sekoitusolosuhteita sekä organogeelien geelinmuodostajien optimaalisia lisäysjärjestyksiä. Edellä mainittujen tekijöiden lisäksi esikokeiden avulla toivottiin saatavan viitteitä myös organogeelien muodostuksessa tarvittavista piidioksidi- ja lesitiinipitoisuuksista. Organogeelinäytteiden tarkastelu esikokeissa on suoritettu visuaalisesti.

### 8.2.1 Komponenttien lisäysjärjestys

Geelinmuodostajien optimaalinen lisäysjärjestys määritettiin työssä esikokeiden avulla. Koska aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella lesitiinin lisääminen kalaöljyä ja piidioksidia sisältäviin seoksiin on saanut aikaan geelien muodostumista, pidettiin tätä lisäysjärjestystä lisäysjärjestyksen suunnittelun lähtökohtana (Griinari M, julkaisematon havainto 2013). Toisaalta pelkkää lesitiiniä sisältäviä organogeelejä valmistetaan tavallisesti lisäämällä orgaanisia liuottimia ja lesitiinejä sisältäviin seoksiin pieniä määriä polaarisia liuottimia (Vintilou ja Leroux 2008). Tältä pohjalta myös käänteistä lisäysjärjestystä, jossa vetysidosten muodostukseen kykenevä piidioksidi lisättäisiin lesitiinien ja kalaöljyjen sekaan vasta myöhemmässä valmistusvaiheessa, voidaan pitää mahdollisena lisäysjärjestyksen vaihtoehtona. Yksi mahdollinen vaihtoehto on myös valmistaa geelit useammassa vaiheessa, sekoittamalla molemmat sakeuttavat aineet ensin kalaöljyjen sekaan erikseen. Koska tässä työssä geelien valmistuksessa oli kuitenkin tarkoitus välttää lämmön käyttöä ja suosia minimiprosessointia, ei useassa vaiheessa tapahtuvaa sekoitusta kannata ehkä pitää lisäysjärjestyksen suunnittelun ensisijaisena lähestymistapana.

Lisäysjärjestyksen vaikutusta organogeelinäytteiden geeliytymiseen ja stabiiliuteen arvioitiin esikokeissa tarkastelemalla kolmella erilaisella menetelmällä valmistettujen näytteiden muodostumista ja viskositeettia silmämääräisesti. Valmistusmenetelminä esikokeissa käytettiin *high shear*-sekoittajana toimivaa, S25N–18G-sekoitussauvalla varustettua, Ultra Turraxia (Ultra Turrax Yellow Line DI25, IKA, Staufen, Saksa); *low shear*-lapasekoittajana toimivaa Kenwood-yleiskonetta (Kenwood Titanium Chef KMC013, Kenwood Limited, Hampshire, Englanti) sekä yksinkertaista lasisauvalla sekoittamista. Silmämääräisen tarkastelun lisäksi Ultra Turraxilla valmistettujen näytteiden reologisia ominaisuuksia tarkasteltiin työssä varsinaisten organogeelinäytteiden reologisten mittausten käytännön harjoittelun yhteydessä dynaamisella rotaatioreometrillä. Ensimmäisessä lisäysjärjestyksessä (Lisäysjärjestys 1) näytteet valmistettiin lisäämällä kalaöljyn sekaan ensin 0,6 % lesitiiniä ja tämän jälkeen 5 % kolloidaalista piidioksidia, kun taas toisessa lisäysjärjestyksessä (Lisäysjärjestys 2) komponenttien lisäys kalaöljyn sekaan toteutettiin päinvastaisessa järjestyksessä.

Kunkin lisäyskerran jälkeen seoksia dispergoitiin huolellisesti komponenttien asianmukaisen sekoittumisen varmistamiseksi. Lisäysjärjestyksen testaus toistettiin muilla kalaöljylaaduilla tulosten luotettavuuden varmistamiseksi.

Vaikka työssä esikokeiden avulla päädyttiinkin määrittämään geelinmuodostajina käytettyjen yhdisteiden optimaalista lisäysjärjestystä, ei kiinteiden lääkeaineiden lisäystä päätetty sisällyttää lisäysjärjestyksen optimointiin. Tämä johtuu siitä, että kiinteiden lääkeaineiden varhaisen lisäämisen arveltiin homogeenisen seoksen säilyttämistarpeen vuoksi lisäävän sekä sekoitukseen tarvittavaa aikaa että sekoituksen tarvittavaa voimakkuutta huomattavasti. Minimiprosessointivaatimuksesta johtuen kiinteät lääkeaineet päädyttiin lisäämään näytteisiin vasta geelinmuodostajakomponenttien lisäämisen jälkeen valmistusprosessin viimeisessä vaiheessa.

### 8.2.2 Sekoituselementtien ja sekoitusolosuhteiden valinta

Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee piidioksidipohjaisten geelien valmistuksessa korkean leikkausnopeuden roottori-staattorisysteemejä tai erilaisia sahalaitaisin terin varustettuja *high shear*-sekoituselementtejä (Aerosil Technical Information No. 1279). Tässä työssä organogeelinäytteet päätettiin minimiprosessointivaatimuksesta johtuen valmistaa kuitenkin kahdella eri sekoituselementillä käyttäen organogeelinäytteiden valmistuksessa sekä *high shear*- että *low shear*-sekoituselementtejä. Sekoituselementit ja niiden optimaaliset sekoitusolosuhteet määritettiin työssä esikokeiden avulla. Seosten sekoituksen aikaiseksi lämpötilamaksimiksi määritettiin kalaöljyjen hapettumisen minimoimiseksi 60 °C.

Laboratoriomittakaavassa organogeelien valmistuksessa käytetään tavallisesti Ultra Turraxia tai erilaisia pienimuotoisia, sahalaitaisin terin varustettuja *high shear*-sekoituselementtejä. Ultra Turrax perustuu niin kutsuttuun roottori-staattori-periaatteeseen, jossa korkealla kehänopeudella pyörivä roottori saa aikaan imun, joka vetää väliaineen roottorin sisään ja työntää sen sitten staattorin hampaiden avulla ulos systeemistä (Andreasen ym. 2012). Roottori-staattorisysteemit voivat sisältää joko

yhden tai kaksi pyörivää päätä. Tässä työssä Ultra Turraxissa on käytetty yhden pyörivän pään sisältävää S25N–18G-sekoitussauvaa, jonka maksimipyörimisnopeus on 24 000 rpm ja maksimiratanopeus 15,9 m/s (IKA 2014). Kuten edellä luvussa 6.2.1 on kuvattu, suosittelee Evonik tuotannon sovelluksissa sekoitusterien ratanopeuksina käytettävän ratanopeuksia väliltä 8–10 m/s (Aerosil Technical Information No. 1279). S25N–18G-sekoitussauvan osalta tämä vastaa pyörimisnopeuksia väliltä 12 075–15 094 rpm. Koska tämän työn tarkoituksena oli kuitenkin esivaatimusten mukaisesti käyttää organogeelinäytteiden valmistuksessa minimiprosessointia, on työssä näytteiden sekoitukseen käytettävä aika ja sekoitusnopeus pyritty optimoimaan mahdollisimman alhaiselle tasolle. Minimiprosessointivaatimuksesta huolimatta sekoitusnopeuksien ja -aikojen optimoinnissa on kiinnitetty huomiota muodostuvien organogeelien homogeenisuuteen ja tasalaatuisuuteen.

Ultra Turraxin lisäksi esikokeissa on sekoituselementteinä testattu leikkaavilla terillä varustettua 500 W tehosekoitinta (Power Blender 6647, OBH Nordica, Tukholma, Ruotsi) sekä lapasekoittimen asemassa toimivaa Kenwood-yleiskonetta. Sekoituselementtejä ja niiden optimaalisia sekoitusolosuhteita arvioitiin esikokeissa kalaöljyn ja piidioksidin 5 % seoksilla. Geelien muodostumista ja viskositeettia tarkasteltiin sekoituksen yhteydessä ja sen jälkeen silmämääräisesti. Osaan seoksista lisättiin geeliytymisen edistämiseksi 0,4–0,7 % lesitiiniä.

### 8.2.3 Lesitiinin määrä

Geelinmuodostajien optimaalisten lisäysjärjestyksien ja valmistuksessa käytettävien sekoituselementtien ja sekoitusolosuhteiden lisäksi esikokeiden avulla toivottiin saatavan viitteitä myös organogeelien muodostuksessa tarvittavista lesitiinipitoisuuksista. Tarvittavia lesitiinipitoisuuksia arvioitiin työssä esikokeiden avulla lisäämällä lasisauvalla sekoitettuihin, kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviin näytteisiin lesitiiniä kasvavassa järjestyksessä. Ensimmäisessä lisäysvaiheessa näytteisiin lisättiin lesitiiniä 0,3 % ja viimeisessä lisäysvaiheessa näytteet sisälsivät lesitiiniä 1,9 %. Lesitiinimääritykset suoritettiin kalaöljylaaduilla 1–3. Edellä esitetyn esikokeen lisäksi lesitiinimäärän vaikutusta organogeelien muodostumiseen ja

viskositeettiin arvioitiin myös erillisessä esikokeessa, jossa lesitiiniä lisättiin kalaöljyalaatua 1 sisältäviin seoksiin yhteensä 5 %. Muodostuvien geelien viskositeettia tarkasteltiin lisäysten yhteydessä ja niiden jälkeen silmämääräisesti.

#### 8.2.4 Piidioksidin laatu ja määrä

Varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa käytettävät piidioksidilaadut määritettiin työssä esikokeiden avulla. Määrittelyssä käytettiin yhteensä neljää erilaista piidioksidilaatua: Aerosil® 200 Pharmaa, Aerosil® 200 VV Pharmaa, Aerosil® 300 Pharmaa sekä hydrofobista Aerosil® R972 Pharmaa. Piidioksidilaatujen vaikutusta kalaöljyjen geeliytymiseen arvioitiin sekoittamalla kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia Ultra Turraxilla S25N-18G-sekoitussauvalla 15 000 rpm sekoitusnopeudella 15 minuutin ajan. Geelien muodostumista ja viskositeettia tarkasteltiin sekoituksen yhteydessä ja sen jälkeen silmämääräisesti.

Koska tämän työn tavoitteena oli organogeelien maistuvuuden ja hoitomyyntyvyyden sekä kalaöljyjen pitoisuuden maksimoimiseksi käyttää piidioksidin osalta mahdollisimman matalia pitoisuuksia, toivottiin esikokeiden avulla saatavan viitteitä piidioksidilaadun lisäksi myös organogeelien valmistuksessa tarvittavista piidioksidipitoisuuksista. Piidioksidipitoisuuden vaikutusta organogeelien muodostumiseen ja viskositeettiin arvioitiin esikokeissa sekoittamalla kalaöljyä ja piidioksidia sisältäviä näytteitä lapasekoittajana toimivalla yleiskoneella 5+5 min sekoitusajalla. Ensimmäisen 5 minuutin sekoituksen jälkeen 1–5 % piidioksidia sisältäviin näytteisiin lisättiin 0,7 % lesitiiniä, minkä jälkeen sekoitusta jatkettiin 5 minuutin ajan. Organogeelien muodostumista tutkittiin piidioksidipitoisuuksilla 1 %, 3 %, 5 %, 7 %, 8 %, 9 % ja 10 %. Piidioksidipitoisuutta 3 % tarkasteltiin lisäksi erillisessä esikokeessa, jossa lesitiinimäärän vaikutusta 3 % piidioksidia sisältävien seosten geeliytymiseen tutkittiin käyttämällä 0,7 % lesitiinipitoisuuksien tilalla 2 % ja 5 % lesitiinipitoisuuksia. 7–9 % piidioksidia sisältäviä näytteitä on esikokeissa valmistettu Kenwood-yleiskoneen lisäksi myös Ultra Turraxilla.

### 8.2.5 Stabiilisuus

Esikokeissa valmistettujen näytteiden stabiilisuutta seurattiin esikokeiden aikana tarkastelemalla ruskeisiin lasiolliin pakattujen näytteiden erottumista silmämääräisesti (Liite 1). Esikokeissa valmistetut geelinäytteet säilytettiin valmistuksen jälkeen huoneenlämpötilassa, valolta suojassa olevassa paikassa, jonka suhteellinen kosteus vaihteli 30–60 % välillä.

### 8.3 Koesuunnittelu

Tämän työn tarkoituksena oli optimoida geelinmuodostajina käytettyjen yhdisteiden laatuja ja määriä sekä valmistusprosesseihin liittyviä sekoitusparametreja kalaöljyä ja kiinteitä lääkeaineita sisältävissä organogeeliformulaatioissa. Geelinmuodostajien optimaalisten laatuojen, pitoisuuksien ja valmistusprosessien välisten parametrien määrittäminen on monimutkainen prosessi, jonka monimutkaisuutta lisää komponenttien välisten yhteisvaikutusten mahdollisuus. Tästä syystä tässä työssä on organogeelien sakeuttavien aineiden laatuojen ja määrien optimoinnin suunnittelussa päädytty käyttämään systemaattista koesuunnittelua. Systemaattisen koesuunnittelun tarkoituksena on selvittää mitkä kokeet kannattaa tehdä, miten tehtävät kokeet kannattaa järjestellä ja miten käytettävissä olevat resurssit on järkevintä käyttää. Systemaattisen koesuunnittelun avulla on lisäksi mahdollista havaita parametrien välisiä yhteisvaikutuksia tehokkaammin, kuin menetelmillä, joissa vain yhtä parametria muutetaan kerrallaan.

Systemaattiseen koesuunnitteluun tarvittavat parametrit määritettiin työssä esikokeiden ja kirjallisuuden perusteella. Sekoituselementteinä työssä päädyttiin käyttämään kahta erilaista sekoituselementtiä: *low shear*- ja *high shear*-sekoituselementtejä. Piidioksidin ja lesitiinin osalta varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa päätettiin puolestaan alkuperäisten suunnitelmien mukaisesti käyttää piidioksidin osalta kahta erilaista piidioksidilaatua ja lesitiinin osalta yhteensä neljää erilaista lesitiinilaatua. Esikokeiden perusteella piidioksidin geelinmuodostusta tehostavana komponenttina haluttiin kuitenkin lesitiinilaatuojen lisäksi tutkia myös tokoferolia, jonka



oletetuksi optimipitoisuudeksi arvioitiin 0,275 %. Lesitiinilaatujen 1 ja 2 pitoisuuksien vaihteluväleiksi päädyttiin työssä esikokeiden ja kirjallisuudesta saatujen tietojen perusteella valitsemaan 0,5–5 %. Tämän jälkeen muiden lesitiinilaatujen pitoisuudet määritettiin lesitiinilaatujen 1 ja 2 fosfatidyylikoliinipitoisuuksien perusteella niin, että valmistettujen näytteiden fosfatidyylikoliinipitoisuudet olivat kaikissa näytteissä käytetystä lesitiinilaadusta riippumatta yhtä suuria.

Työssä valmistetut organogeeliformulaatit määritettiin edellä esitettyjen parametrien perusteella systemaattiseen koesuunnitteluun pohjautuvan Modde-ohjelman avulla (MODDE 10.1, Umetrics AB, Umeå, Ruotsi). Modde on faktorikokeisiin perustuva koesuunnitteluohjelma, jossa koesuunnittelun tavoitteena on ennustaa parhaat prosessiparametrit mahdollisimman pienellä koemäärällä (Pudas 1999). Tässä työssä Modde-ohjelmaa on käytetty hyväksi koesarjan suunnittelussa. Modde-ohjelman avulla suunniteltujen, työssä valmistettujen organogeeliformulaatioiden koostumuksia ja sekoituselementtejä on kuvattu taulukossa 7.

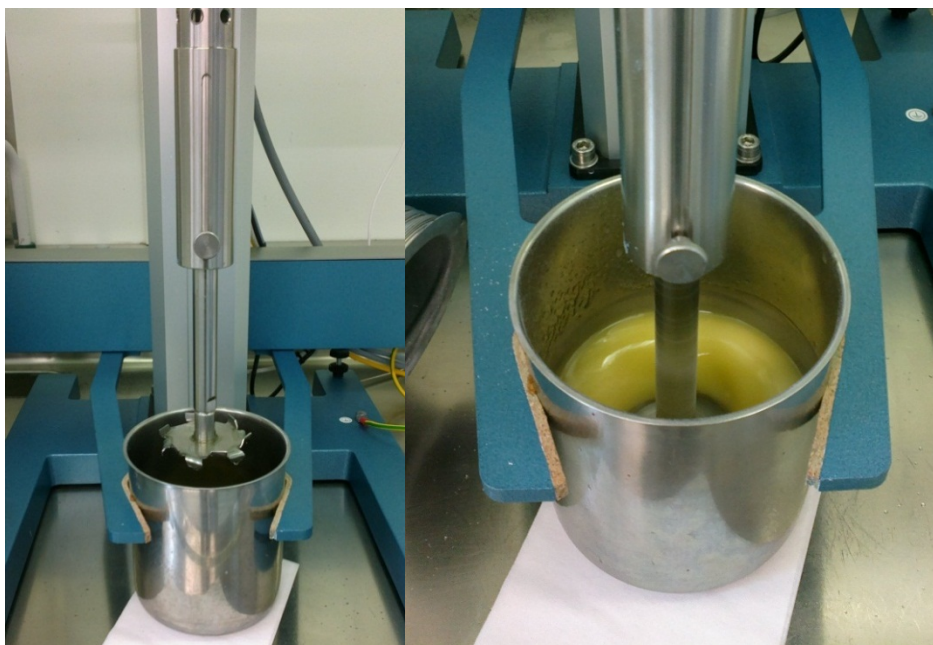
Taulukko 7. Työssä valmistetut, koesarjan mukaiset organogeeliformulaatit. Organogeelinäytteiden valmistuksessa on käytetty vakiopiidioksidipitoisuutta 5 %. Geelinäytteissä G35–G40 on piidioksidin osalta taulukon mukaisesti käytetty kuitenkin 5 %:sta poikkeavaa pitoisuutta.

<b>Geelin nimi</b>	<b>Pinta-aktiivinen aine</b>	<b>Pinta-aktiivisen aineen määrä (%)</b>	<b>Aerosil®-laatu</b>	<b>Sekoituselementti</b>
G1	Lesitiini 1	0,5	200	Low shear
G2	Lesitiini 1	2,75	200	Low shear
G3	Lesitiini 1	2,75	200	Low shear
G4	Lesitiini 1	2,75	200	Low shear
G5	Lesitiini 1	5,0	200	Low shear
G6	Lesitiini 2	0,5	200	Low shear
G7	Lesitiini 2	2,75	200	Low shear
G8	Lesitiini 2	5,0	200	Low shear
G9	Lesitiini 3	0,33	200	Low shear
G10	Lesitiini 3	1,83	200	Low shear

G11	Lesitiini 3	3,33	200	Low shear
G12	Lesitiini 4	0,23	200	Low shear
G13	Lesitiini 4	1,28	200	Low shear
G14	Lesitiini 4	2,33	200	Low shear
G15	Tokoferoli	0,05	200	Low shear
G16	Tokoferoli	0,275	200	Low shear
G17	Tokoferoli	0,5	200	Low shear
G18	Lesitiini 1	0,5	300	Low shear
G19	Lesitiini 1	2,75	300	Low shear
G20	Lesitiini 1	5,0	300	Low shear
G21	Lesitiini 2	0,5	300	Low shear
G22	Lesitiini 2	2,75	300	Low shear
G23	Lesitiini 2	5,0	300	Low shear
G24	Lesitiini 3	0,33	300	Low shear
G25	Lesitiini 3	1,83	300	Low shear
G26	Lesitiini 3	3,33	300	Low shear
G27	Lesitiini 4	0,23	300	Low shear
G28	Lesitiini 4	1,28	300	Low shear
G29	Lesitiini 4	2,33	300	Low shear
G30	Tokoferoli	0,05	300	Low shear
G31	Tokoferoli	0,275	300	Low shear
G32	Tokoferoli	0,5	300	Low shear
G33	-	0	200	High shear, 15 min
G34	-	0	300	High shear, 15 min
G35	-	0	200, <b>10 %</b>	High shear, 15 min
G36	-	0	200, <b>10 %</b>	Low shear
G37	-	0	200, <b>9 %</b>	Low shear
G38	-	0	200, <b>8 %</b>	Low shear
G39	-	0	200, <b>7 %</b>	Low shear
G40	-	0	200, <b>6 %</b>	Low shear
G41	-	0	200	Low shear

#### 8.4 Näytteiden valmistus, pakkaaminen ja säilytys

Koska esikokeissa testatut *high shear*-sekoituselementit eivät toimineet organogeelinäytteiden valmistuksessa toivotulla tavalla, päädyttiin varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa käyttämään *high shear*-sekoituselementtinä sahalaitaisin terin varusteltua, dissolver-tyyppistä DISPERMAT® AE4-sekoitinta (DISPERMAT® AE4-C1, Serial number A1002251, VMA-Getzmann GmbH, Reichshof, Saksa). *High shear*-sekoittimella valmistetut geelinäytteet valmistettiin työssä Teknos Oy:n Pitäjänmäen konttorilla 80 mm:n sahalaitaisella sekoitusterällä, käyttämällä laitteen sekoitusnopeutena 2380 rpm sekoitusnopeutta ja sekoitusaikana 3–15 min pituista sekoitusaikaa (Kuva 5). Valittu sekoitusnopeus vastasi Aerosilin® valmistajan teollisuuden käyttöön suosittelemia terien ratanopeuksia (Aerosil Technical Information No. 1279; Lortz sähköpostiviesti 2011). Ennen varsinaisen *high shear*-sekoituksen aloittamista piidioksidi esidispergoitiin kalaöljyn sekaan matalalla, 480 rpm sekoitusnopeudella, käyttämällä näytteiden sekoitusaikoina näytteestä riippuen noin 2–3 minuutin pituisia sekoitusaikoja.



Kuva 5. *High shear*-sekoituksessa käytetty DISPERMAT® AE4-C1-sekoitin 80 mm:n sahalaitaisella sekoitusterällä.

Varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa *low shear*-sekoituselementtinä käytettiin puolestaan lapasekoittajana toimivaa Kenwood-yleiskonetta (Kuva 6). Kenwood-yleiskoneessa käytetty vakiosekoitusnopeus 1 vastasi valmistajalta saatujen tietojen perusteella sekoitinlavan pyörimisnopeutta 60 rpm (Salovaara sähköpostiviesti 2014). Geelinäytteiden valmistus aloitettiin raaka-aineiden punnituksilla. Raaka-aineiden punnitusten jälkeen seoksia esidispergoitiin lasisauvalla 2 minuutin ajan ennen niiden varsinaisen *low shear*-sekoituksen aloittamista. Varsinainen *low shear*-sekoitus suoritettiin yleiskoneella vakiosekoitusnopeudella 1 käyttäen sekoitusaikana 5+5 minuutin pituista sekoitusaikaa. Ensimmäisen 5 minuutin sekoituksen jälkeen näytteisiin lisättiin koesarjan mukainen määrä pinta-aktiivista ainetta, jonka jälkeen sekoitusta jatkettiin samalla vakiosekoitusnopeudella vielä 5 minuutin ajan. Molempien gelaattorikomponenttien lisäämisen ja huolellisen sekoittamisen jälkeen näytteistä otettiin ensimmäiset 30 g osanäytteet, jotka pakattiin ruskeisiin lasiolliin suojaan sekä valon että kosteuden vaikutuksilta. Varsinaisten geelinäytteiden ottamisen jälkeen yleiskoneen sekoitusastiassa jäljellä olevaan seosmassaan lisättiin 20 % kiinteitä lääkeaineita ja sekoitusta jatkettiin lapasekoittajalla 5 minuutin ajan kiinteiden lääkeaineiden asianmukaisen sekoittumisen varmistamiseksi. Kiinteitä lääkeaineita sisältävistä seoksista otettiin lopuksi toiset osanäytteet tulpalla peitettyihin koeputkiin, joista näytteiden erottumista seurattiin valmistuksen jälkeen silmämääräisesti. Työssä valmistettujen organogeelinäytteiden säilytys tapahtui huoneenlämpötilassa, valolta suojassa olevassa paikassa, jonka lämpötila vaihteli säilytyksen aikana välillä 21.2 °C – 22.7 °C ja suhteellinen kosteus välillä 42 % – 67 %.



Kuva 6. *Low shear*-sekoituksessa käytetty Kenwood Titanium Chef KMC013-yleiskone lapasekoitinpäällä.

Varsinaisista koesarjan organogeelinäytteistä saatujen reologisten mittausten tulosten perusteella työssä päätettiin alkuperäisten koesarjan organogeelinäytteiden lisäksi valmistaa myös muutamia ylimääräisiä, reologisiin mittauksiin ja/tai Cryo-TEM-mikroskopointeihin tarkoitettuja organogeelinäytteitä. Ylimääräisinä organogeelinäytteinä valmistettujen näytteiden koostumuksia on kuvattu taulukossa 8. Näytteet G52–G55 on valmistettu työn tilaajan toiveesta työn loppuvaiheessa suoritettuja reologisia mittauksia varten, minkä vuoksi näytteistä ei ole muiden työssä valmistettujen geelinäytteiden tapaan saatavilla stabiilisuuteen liittyviä tietoja.

Taulukko 8. Varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden lisäksi valmistetut ylimääräiset organogeelinäytteet. Ylimääräisten organogeelinäytteiden valmistuksessa on käytetty vakiopiidioksidipitoisuutta 5 %.

<b>Geelin nimi</b>	<b>Pinta-aktiivinen aine</b>	<b>Pinta-aktiivisen aineen määrä (%)</b>	<b>Aerosil®-laatu</b>	<b>Sekoituselementti</b>
G42	Lesitiini 6	0,5	300	Low shear
G43	Lesitiini 6	2,75	300	Low shear
G44	Lesitiini 6	5	300	Low shear
G45	Lesitiini 7	0,5	300	Low shear
G46	Lesitiini 7	2,75	300	Low shear
G47	Lesitiini 7	5	300	Low shear
G48	Lesitiini 1	0,2	200	Low shear
G49	Lesitiini 1	0,3	200	Low shear
G50	Lesitiini 1	0,4	200	Low shear
G51	Lesitiini 1	0,1	200	Low shear
G52	-	0	200	High shear, 3 min
G53	-	0	200	High shear, 6 min
G54	-	0	200	High shear, 9 min
G55	-	0	200	High shear, 15 min

### 8.5 Analyysit

Koesarjan mukaisesti valmistettujen organogeelinäytteiden rakennetta ja viskoelastisia ominaisuuksia on tässä työssä tarkasteltu elektronimikroskoopin ja dynaamisen rotaatioreometrin avulla. Reologiset mittaukset on suoritettu kaikille näytteille 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta. Osalle näytteistä mittaukset on toistettu 3 kuukauden kuluttua näytteiden valmistuksesta niiden säilytyksen aikaisen stabiilisuuden arvioimiseksi. Kiinnostavimmiksi arvioitujen näytteiden rakennetta on lisäksi tarkasteltu työssä elektronimikroskoopin avulla 1 viikon ja yhdestä näytteestä 10 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta.

### 8.5.1 Dynaaminen rotaatioreometri

Dynaamisissa rotaatioreometreissa voidaan käyttää yhteensä neljää erilaista mittaageometriaa: levy-levy-, kartio-levy-, sylinteri- tai vääntösauvageometrioita (Laukkanen 2013). Levy-levy- ja kartio-levygeometriat ovat mittaageometrioista yleisimmin käytettyjä. Kartio-levy-geometriassa leikkausnopeus pysyy vakiona kaikkialla näytteessä, mutta levy-levy-mittaageometriaa käytettäessä leikkausnopeus vaihtelee ollen suurimmillaan levyn reunassa ja pienimmillään levyn keskikohdassa. Tässä työssä organogeelinäytteiden analysoinnissa on käytännön kokemusten perusteella käytetty mittaageometriana levy-levy-mittaageometriaa (Plate SST ST 20 mm, serial number 985634, TA Instruments, New Castle, Yhdysvallat).

Leikkausviskositeettimittausten lisäksi rotaatioreometriä voidaan käyttää myös dynaamisissa, oskillointitilassa suoritettavissa mittauksissa materiaalien viskoelastisten ominaisuuksien määrittämisessä. Tällöin mittauksista saadut tulokset esitetään tyypillisesti neljän parametrin; kompleksisen leikkausmoduulin, häviömoduulin, varastomoduulin ja häviötangentin; avulla. Oskillaatiotestissä viskoelastiset näytteet altistetaan eripituisille sinusoidaalisille oskilloiville leikkausvoimille/jännityksille, joita vastaavat sinusoidaaliset leikkausvoimat/jännitykset mitataan. Lineaarisesti käyttäytyvillä viskoelastisilla materiaaleilla jännityksen tuottama amplitudi on suoraan verrannollinen leikkausvoimien tuottamaan amplitudiin ja jännitys vaihtelee sinusoidaalisesti samalla taajuudella, mutta eri faasissa kuin leikkausvoimat (Barry 1974). Reologisia määrittämiä ja viskoelastisuutta on tässä työssä aikaisemmin käsitelty luvuissa 3.3.1 ja 3.4.4.

Varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden reologiset mittaukset suoritettiin työssä Helsingin Yliopiston Polymeerikemian laitoksella TA Instruments AR200 jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 20 °C lämpötilassa (Serial number 4D2524, TA Instruments, New Castle, Yhdysvallat). Kaikille näytteille suoritettiin yhteensä kolme erilaista mittausta: venymä-pyyhkäisy- (*strain sweep*), taajuus-pyyhkäisy- (*frequency sweep*) ja vakaan tilan virtausmittaus (*steady state flow*). Venymä-pyyhkäisymittausten tarkoituksena oli yksilöllisesti määrittää kullekin näytteelle sopivat taajuus-pyyhkäisymittauksissa käytettävät venymän arvot sekä varastostabiilisuutta

kuvaavat myötörajan arvot. Näytteiden paksuutta ja stabiilisuutta arvioitiin puolestaan taajuus-pyyhkäisymittauksista saatujen varasto- ja häviömoduulien perustasojen sekä kompleksisten leikkausviskositeettien arvojen perusteella. Varsinaiset viskositeetti-arvot määritettiin näytteille leikkausnopeuksien funktiona vakaan tilan virtausmittausten tulosten perusteella. Vakaan tilan virtausmittauksissa näytteisiin kohdistetaan leikkausjännitys, jonka aikaansaama viskositeetti mitataan, kun näytteet saavuttavat vakaan tilan virtauksensa. Vakaan tilan virtauksen saavutettuaan näytteisiin kohdistuvaa leikkausnopeutta kasvatetaan logaritmisesti, ja prosessi toistetaan uudelleen varsinaisen viskositeettikäyrän muodostamiseksi. Koska tässä työssä lineaaristen viskoelastisten alueiden pituudet vaihtelivat oskillointimittauksista saatujen tulosten perusteella näytteiden välillä voimakkaasti, ei työssä valmistetuille organogeelinäytteille päätetty suorittaa luvussa 3.4.4 kuvattua *creep recovery*-testiä (Yrjänäinen 2002).

Reologisten mittausten tulosten toistettavuutta arvioitiin työssä erillisten, esikokeina suoritettujen toistomittausten tulosten perusteella. Koska peräkkäisten mittausten tulosten havaittiin esikokeiden perusteella olevan riittävällä tarkkuudella toistettavia, päätettiin varsinaiseen koesarjaan kuuluvien organogeelinäytteiden reologiset mittaukset suorittaa näytteille vain kertaalleen. Koska mittausten suoritusjärjestyksellä havaittiin kuitenkin esikokeiden perusteella olevan vaikutusta varasto- ja häviömoduulien sekä varsinaisten viskositeettien arvoihin, suoritettiin reologiset mittaukset kaikille näytteille samassa, edellä kuvatussa järjestyksessä.

Kaikille työssä valmistetuille geelinäytteille määritettiin edellä esitettyjen moduulien ja häviötangenttien arvojen lisäksi myös niin kutsuttu myötöräjä (*yield stress*), jonka avulla näytteiden varastostabiilisuutta on mahdollista arvioida työhön kuuluvan 3 kk säilytysajanjakson jälkeen luotettavasti (TA Instruments AAN016). Säilytyksen aikana pienentyneiden myötörajojen arvojen voidaan yleisesti arvioida indikoivan lopputuotteiden stabiilisuuden heikentymistä. Myötöräjällä tarkoitetaan pistettä, jonka jälkeen näyte venyy ja muokkautuu ilman voiman lisäystä (Materiaalien mekaaniset ominaisuudet 2011). Materiaalien on myötörajan saavutettuaan arvioitu siis käyttäytyvän täysin plastisesti.



Organogeelinäytteiden kompleksinen leikkausviskositeetti ( $\eta^*$ ) voidaan määrittää oskillointimittauksista saatujen varasto- ja häviömoduulien sekä kulmanopeuden  $\omega$  perusteella kaavan (1) mukaisesti.

$$|\eta^*| = \sqrt{\left(\frac{G'}{\omega}\right)^2 + \left(\frac{G''}{\omega}\right)^2}, \quad (1)$$

Varasto- ja häviömoduulien arvojen perusteella näytteiden viskoosisten ja elastisten ominaisuuksien välistä suhdetta kuvaava häviötangentti lasketaan puolestaan kaavan (2) avulla seuraavasti.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2)$$

### 8.5.2 Cryo-TEM

Kryoskooppisella läpäisyelektronimikroskoopilla (*Cryo-TEM*) suoritettavassa rakennetutkimuksessa jäädytettyjen geelinäytteiden läpi ohjataan magneettilinssien avulla elektronisuihku, joka laitteen objektiiv- ja projektiolinssien läpi kulkiessaan saa näytteistä aikaan jopa miljoonakertaisia suurennoksia (Danino ja Talmon 2006). Läpäisyelektronimikroskoopin avulla geelien kolmiulotteisten verkostojen rakennetta on mahdollista tarkastella nanometriluokassa.

Joidenkin arvioiden mukaan Cryo-TEM-menetelmän heikkoutena organogeelien rakenteiden tarkastelussa olisi menetelmään soveltuvien näytteiden ohuus, sillä menetelmällä on tavallisesti havaittu olevan mahdollista tarkastella vain alle 300 nm paksuisia näytteitä (Rogers ym. 2007). Organogeelien säikeiden välisten vuorovaikutusten tarkastelemista on myös arvosteltu, sillä samassa fokaalisessa tasossa olevien säikeiden havaitseminen on joissakin tapauksissa osoittautunut haasteelliseksi. Danino (2000) tutkimusryhmineen havaitsivat lisäksi Cryo-TEM-menetelmään liittyvän näytteiden käsittelyn vaikuttavan eräiden näytteiden mikrorakenteisiin haitallisesti,

mutta vastaavaa haitallista vaikutusta useimpien näytteiden mikrorakenteisiin ei kuitenkaan havaittu.

Tässä työssä Cryo-TEM-menetelmän avulla toivottiin olevan mahdollista tarkastella organogeelinäytteiden kolmiulotteisia verkkorakenteita sekä ymmärtää mahdollisia toimintaperiaatteita pinta-aktiivisten aineiden sakeuttavien ominaisuuksien taustalla. Organogeelinäytteiden Cryo-TEM-määritykset suoritettiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan Instituutin Cryo-EM yksikössä 200 kV Tecnai F20 läpäisyelektronimikroskoopilla -180 °C lämpötilassa (FEI Tecnai F20 Field Emission Gun Transmission Electron Microscope, Philips Electron Optics, Eindhoven, Hollanti). Cryo-TEM-näytteet valmistettiin mikroskopointia varten Leica EM GP-jäädäytyslaitteella niin kutsutulla *bare grid*-tekniikalla (Leica EM GP, Automatic Plunge Freezing with Bare Grid Technique, Leica Microsystems, Wetzlar, Saksa). Näytteiden valmistus aloitettiin jäädäyttämällä työasema nestemäisellä typellä -174 °C lämpötilaan ja lisäämällä laitteen jäädäytyssäiliöön etaania, jonka avulla varsinaisten geelinäytteiden pikajäädäytys toteutettiin. Työaseman jäädäyttämisen jälkeen organogeelinäytteet asetettiin rei'itetyllä hiilikalvolla päällystetyn Quantifoil-näytehilan pinnalle ja niille suoritettiin niin kutsuttu suodatinpaperiblottaus 2 x 1,5 s blottausajalla. Blottauksen jälkeen näytteet laskettiin etaaniin ja jäädäytettiin nopeasti. Läpäisyelektronimikroskooppikuvat tallennettiin 69 000-kertaisella suurennoksella Gatan Ultrascan 4000-(Ultrascan™ 4000, Gatan Inc., Pleasanton, CA, Yhdysvallat) kameralla.

Cryo-TEM-määritykset suoritettiin työssä geelinäytteille G46 ja G55. Näytteen G46 kolmiulotteista rakennetta tarkasteltiin Cryo-TEM-mikroskoopilla 10 viikon kuluttua näytteen valmistuksesta. Näytteen G55 kohdalla tarkastelu Cryo-TEM:llä suoritettiin 1 viikon kuluttua näytteen valmistuksesta.

## 9. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 9.1 Esikokeiden tulokset

Tässä työssä esikokeiden avulla oli tarkoitus tutkia varsinaisten organogeelinäytteiden valmistuksen kannalta oleellisten parametrien vaikutusta organogeelien muodostumisen ja viskositeetin kannalta. Esikokeissa valmistettujen näytteiden muodostumista ja erottumista on kuvattu liitteessä 1. Joitakin esikokeita on suoritettu samoilla parametreilla useampaan otteeseen tulosten luotettavuuden varmistamiseksi.

#### 9.1.1 Komponenttien lisäysjärjestys

Optimaalista geelinmuodostajien lisäysjärjestystä tutkittiin esikokeissa kahdella eri lisäysjärjestyksellä luvun 8.2.1 mukaisesti (Liite 1: E1–E4 ja E49–E50). Kummallakin lisäysjärjestyksellä näytteiden havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna muodostuvan samalla tavalla sekä olevan viskositeeiltaan vastaavanlaisia käytetystä kalaöljyalaadusta ja sekoitusmenetelmästä riippumatta. Yleiskoneella lisäysjärjestyksellä 2 valmistettujen näytteiden havaittiin kuitenkin kolmen vuorokauden kuluttua näytteiden valmistuksesta olevan viskositeeiltaan korkeampia sekä sisältävän koostumuksessaan vähemmän ilmakuplia kuin vastaavanlaisten, lisäysjärjestyksellä 1 valmistettujen näytteiden.

Ultra Turraxilla valmistettujen organogeelinäytteiden reologisia ominaisuuksia dynaamisella rotaatioreometrillä määritettäessä, havaittiin lisäysjärjestyksellä 1 valmistettujen geelinäytteiden olevan lisäysjärjestyksellä 2 valmistettuja geelinäytteitä epästabiilimpia. On kuitenkin huomattava, että koska geelinäytteitä käytettiin vain reologisten mittausten käytännön suorittamisen harjoittelemisessa, saattoi mittauskertojen välillä esiintyä joitakin vaihteluita. Lisäksi on huomioitava, että näytteiden valmistus oli ennen mittausten suorittamista tapahtunut eri päivinä niin, että lisäysjärjestystä 1 käyttävä näyte oli valmistettu 5 päivää ja lisäysjärjestystä 2 käyttävä näyte 10 päivää ennen mittausten suorittamista. Koska tämän työn esikokeiden ja kirjallisuudesta saatujen tietojen perusteella organogeelinäytteiden arvioitiin

saavuttavan maksimiviskositeettinsa noin viikon kuluessa näytteiden valmistuksesta, onkin mahdollista, ettei lisäysjärjestyksellä 1 valmistettu näyte ollut mittausten suorittamisvaiheessa vielä saavuttanut maksimiviskositeettiaan (Nippe ja General 2014).

Aikaisempien tutkimusten sekä tämän työn esikokeiden perusteella varsinaiset koesarjan organogeelinäytteet päätettiin valmistaa lisäysjärjestyksellä 2, lisäämällä piidioksidi kalaöljyn sekaan ennen lesitiiniä (Griinari M, julkaisematon havainto 2013). Lisäysjärjestyksen valintaa tuki Aerosilin® valmistajalta saatu tekninen dokumentaatio, jonka mukaan piidioksidi suositellaan dispergoitavaksi öljyn sekaan ennen muiden komponenttien lisäämistä (Aerosil Technical Information No. 1279). Vaikka lesitiinin aiemman lisäämisen havaittiinkin aavistuksen nopeuttavan piidioksidin sekoittumista kalaöljyjen sekaan pieniä lesitiinipitoisuuksia käytettäessä, on kuitenkin mahdollista, että suurten lesitiinipitoisuuksien kohdalla myöhäisemmässä vaiheessa lisätty piidioksidi ei välttämättä pääsisi geelien nopean muodostumisen seurauksena kostumaan kunnolla. Huonosti kostunutta piidioksidia sisältävät geelit ovat hyvin kostunutta piidioksidia sisältäviin organogeeleihin verrattuna todennäköisemmin epätasalaatuisia (Aerosil Technical Information No. 1279).

#### 9.1.2 Ultra Turrax

Ultra Turraxin sekoitusaikojen tai -nopeuksien ei silmämääräisesti tarkasteltuna havaittu vaikuttavan organogeelien muodostumiseen tai viskositeettiin kalaöljylaatua 1 geelipohjana käytettäessä, kun kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviin seoksiin lisättiin sekoituksen loppupuolella mukaan 0,7 % lesitiiniä (Liite 1: E5–E7). Kalaöljylaatua 1 sisältävien näytteiden havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna muodostuvan samalla tavalla sekä olevan viskositeettiasteiltaan vastaavanlaisia riippumatta siitä, käytettiinkö dispergoinnissa Ultra Turraxia vai toteutettiin sekoitus vain kevyesti lasisauvalla sekoittamalla. Esikokeissa Ultra Turraxia testattiin erilaisilla sekoitusnopeuksilla, mutta varsinaisena sekoitusnopeutena esikokeissa päädyttiin lopulta käyttämään sekoitusnopeuksia väliltä 13 000–17 000 rpm. Käytetyt sekoitusnopeudet olivat Evonikin antamiin suositusarvoihin nähden korkeita, koska vasta näin suurten

sekoitusnopeuksien havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna sekoittavan 400 ml:n kapeaan dekanterilasiin mitattuja kalaöljyä 1 tai 4 sekä 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia pintaa myöden (Aerosil Technical Information No. 1279). Pienemmillä sekoitusnopeuksilla Ultra Turrax näytti sekoittavan seoksia astioiden pohjalla, mutta silmin havaittavaa liikettä seosten pinnalla ei kuitenkaan ollut havaittavissa. Ultra Turraxin 13 000 rpm sekoitusnopeuden havaittiin 10 minuutin sekoitusajan jälkeen nostaneen näytteiden lämpötilaa 25 °C asteesta 38 °C asteeseen, kun taas näytteitä 17 000 rpm sekoitusnopeudella ja 15 min sekoitusajalla sekoitettaessa näytteiden lämpötila nousi lähelle työssä sallittua lämpötilamaksimi ollen 55 °C (Liite 1: E20 ja E21) (Aerosil Technical Information No. 1279). Vaikka kalaöljyalaatua 1 sisältävien näytteiden havaittiinkin heti lesitiinilisäysten jälkeen vastaavan toisiaan sekoitusmenetelmästä ja sekoitusvoimakkuudesta riippumatta, voitiin käsin sekoitettujen näytteiden havaita odotetusti erottuneen jo viidentenä päivänä organogeelinäytteiden valmistuksesta, kun taas osa Ultra Turraxilla sekoitetuista näytteistä säilyi stabiileina ainakin 3 kuukauden ajan näytteiden valmistuksesta (Aerosil Technical Information No. 1279).

Kun kalaöljyalaatujen 1 tai 4 tilalla käytettiin kalaöljyalaatua 2 tai 3, havaittiin organogeelien muodostumisessa selkeä muutos. Toisin kuin kalaöljyalaatujen 1 ja 4, kalaöljyalaatujen 2 ja 3 havaittiin muodostavan geelejä pelkän 5 % piidioksidin kanssa, kun Ultra Turraxin sekoitusnopeutena käytettiin 17 000 rpm sekoitusnopeutta (Liite 1: E9–E11). Varmaa syytä seosten erilaiseen geeliytymiseen ei vielä tiedetä. Kalaöljyalaadun 2 tiedetään kuitenkin poikkeavan muista esikokeissa käytetyistä kalaöljyalaaduista sisältämänsä pinta-aktiivisen tokoferolin perusteella. Varsinaisen koesarjan havaintojen perusteella tokoferolin ei kuitenkaan pitoisuusvälillä 0,05–0,5 % havaittu saavan aikaan näytteiden sakeutumista esikokeissa havaitulla tavalla. Kalaöljyalaadun 3 ei tällä hetkellä saatavilla olevien tietojen perusteella tiedetä sisältävän koostumuksessaan kalaöljyalaadun 2 tavoin pinta-aktiivista tokoferolia tai muita pinta-aktiivisia aineita. On kuitenkin mahdollista, että kalaöljyalaatu 3 poikkeaisi muista esikokeissa käytetyistä kalaöljyalaaduista öljykomponenttiensa osalta, sillä sen havaittiin esikokeiden perusteella muodostavan muihin kalaöljyalaatuihin nähden aiempaa sameampia ja läpinäkymättömiä geelejä, todennäköisesti sisältämiensä

öljykomponenttien erilaisten refraktiivisten indeksien perusteella (Keck 2006; Hapgood 2009a).

Kalaöljyalaaduilla 2 ja 3 havaitun viskositeettien voimakkaan kasvun ja geeliytymisen seurauksena Ultra Turrax ei S25N–18G-sekoitussauvalla kyennyt sekoittamaan geeliytyneitä seoksia enää pintaa myöden edes maksimisekoitusnopeutta 24 000 rpm käytettäessä, vaan geelit jouduttiin dispergoinnin jälkeen saattamaan tasa-aineisiksi lasisauvalla. Kun näin muodostettuihin kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviin geeleihin lisättiin sekoituksen jälkeen 0,7 % lesitiiniä, havaittiin geeleissä silmämääräisesti tarkasteltuna vain hyvin vähäistä viskositeetin kohoamista (Liite 1: E12–E14).

Vaikka kalaöljyalaaduilla 1 ja 4 ei pelkän 5 % piidioksidin kanssa saatukaan muodostettua geelejä Ultra Turraxilla heti sekoituksen jälkeen, oli seosten viskositeetti silmämääräisesti tarkasteltuna kuitenkin jo vuorokauden kuluttua näytteiden valmistuksesta selkeästi kohonnut (Liite 1: E15–E16 ja E20–E21). Neljäntenä ja kuudentena päivänä valmistuksesta seosten viskositeettien havaittiin edelleen kohonneen, mutta viskositeetteja kymmenentenä päivänä valmistuksen jälkeen tarkasteltaessa, viskositeeteissa ei silmämääräisesti tarkasteltuna havaittu enää tapahtuneen muutoksia. Esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella seosten arvioitiin saavuttavan maksimiviskositeettinsa kirjallisuuden mukaisesti noin viikon kuluessa geelinäytteiden valmistuksesta (Nippe ja General 2014). Tämä esikokeissa tehty havainto tuki reologisten mittausten suorittamiseen valittua 1 viikon mittauspistettä. Vaikka sekä 2 min että 5 min sekoitettujen, kalaöljyalaatua 1 sisältävien näytteiden viskositeettien havaittiinkin nousevan valmistuksen jälkeen selkeästi, oli 5 min sekoitettujen seosten viskositeetti silmämääräisesti tarkasteltuna kuitenkin 2 min sekoitettujen seosten viskositeettia selkeästi korkeampi.

Kun kalaöljyalaatua 4 sisältävissä seoksissa näytteiden piidioksidipitoisuutta kasvatettiin yli 5 %:n, havaittiin geelien muodostumisen olevan mahdollista myös Ultra Turraxilla. Goupalen ja Raj Kapoorin (2011) tutkimusten tavoin 7 % piidioksidipitoisuuden ei kalaöljypohjaisissa seoksissa havaittu saavan aikaan geelien muodostumista, mutta

näytteiden piidioksidipitoisuutta 8 %:iin tai 9 %:iin kasvatettaessa, geelien havaittiin kuitenkin muodostuvan myös kalaöljypohjaisissa seoksissa toivotusti (Liite 1: E36–E38). Kun näytteiden piidioksidipitoisuutta kasvatettiin 10 %:iin, havaittiin geelien muodostumisen olevan jo lasisauvalla suoritettun esidispergoinnin aikana niin voimakasta, ettei geelejä uskallettu enää sekoittaa Ultra Turraxilla (Liite 1: E39). Ultra Turraxilla valmistettujen, 8 % ja 9 % piidioksidia sisältävien, näytteiden havaittiin kuitenkin yllättäen olevan viskositeeiltaan Aerosilin® valmistajalta saadun teknisen dokumentaation vastaisesti yleiskoneella valmistettuja näytteitä vähemmän viskooseja (Aerosil Technical Information No. 1279). Varmaa syytä havainnolle ei vielä tiedetä. On kuitenkin mahdollista, että näytteiden erilainen käyttäytyminen voisi johtua *high shear*-sekoituselementin voimakkaasta, mahdollisesti geelien kolmiulotteisen rakenteen rikkovasta sekoitusvoimasta.

Koska minimiprosessointivaatimuksen lisäksi tämän työn tarkoituksena oli käyttää organogeelien valmistuksessa piidioksidin osalta mahdollisimman matalia pitoisuuksia, päätettiin alalla yleisesti käytössä oleva Ultra Turrax lopulta pitkän harkinnan jälkeen hylätä esikokeiden perusteella varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden *high shear*-valmistuksesta.

### 9.1.3 Tehosekoitin

Ultra Turraxin lisäksi esikokeissa testattiin *high shear*-sekoituselementtinä leikkaavilla terillä varustettua 500 W tehosekoitinta (Liite 1: E22 ja E33–E35). Toisin kuin Ultra Turraxin, tehosekoittimen havaittiin muodostavan ohuita geelejä myös pelkkää kalaöljylaatua 4 sekä 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia sekoitettaessa, kunhan sekoitettavan massan määrä laitteessa pidettiin riittävän alhaisena. Ennen lesitiinilisäystä muodostuneet geelit olivat koostumukseltaan ja viskositeetiltaan heti valmistuksen jälkeen kuitenkin selkeästi Ultra Turraxilla valmistettuja, kalaöljylaatuja 2 tai 3 sisältäviä näytteitä valuvampia ja ulkonäöltään sameampia. Näytteiden viskositeettien havaittiin kuitenkin nousevan säilytyksen aikana nopeasti niin, että alle vuorokauden kuluttua näytteiden valmistuksesta, vastasivat tehosekoittimella valmistettujen näytteiden viskositeetit Ultra Turraxilla valmistettujen näytteiden

viskositeetteja. Tehosekoittimella valmistettuihin, jo geelitytyneisiin seoksiin lesitiiniä lisättäessä, havaittiin muodostuvien geelien olevan paksuja ja jähmeitä, viskositeeiltaan toivotun kaltaisia. Vaikka tehosekoittimen havaittiinkin muodostavan geelejä pieniä öljymääriä käytettäessä, ei laite kuitenkaan kyennyt sakeuttamaan suuria öljymääriä geelimäisiksi. Lisäksi suuria öljymääriä sekoitettaessa, seosten värin havaittiin alle 5 minuutin kuluttua sekoituksen aloittamisesta muuttuvan keltaisesta myrkyneihertäväksi, minkä arvioitiin indikoivan öljyjen hapettumista (Gravelle ym. 2012). Pieniä sekoitusmääriä käytettäessä muodostuvien geelien havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna sisältävän runsaasti ilmakuplia, minkä arvioitiin olevan kalaöljyjen hapettumisen ja geelien säilyvyyden kannalta ei-toivottua. Näiden syiden vuoksi Ultra Turraxin lisäksi myös tehosekoitin päädyttiin lopulta hylkäämään varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden *high shear*-valmistuksesta.

#### 9.1.4 Yleiskone

*Low shear*-sekoituselementtinä esikokeissa käytettiin lapasekoittajana toimivaa Kenwood-yleiskonetta (Liite 1: E23–E28 ja E40). Yleiskoneen havaittiin esikokeiden perusteella kykenevän geelien muodostukseen odotetusti vain tapauksissa, joissa kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviin seoksiin lisättiin piidioksidin geelinmuodostusta tehostavaksi komponentiksi lesitiiniä (Aerosil Technical Information No. 1279). Lesitiinin lisäykset seoksiin toteutettiin yleiskoneella sekoitusnopeudella 1, koska suurempien sekoitusnopeuksien havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna lisäävän ilmakuplien määrää seoksissa huomattavasti. Kun piidioksidipitoisuutta seoksissa kasvatettiin 5 %:sta 8–10 %:iin, havaittiin geelien kuitenkin muodostuvan myös yleiskoneella ilman lesitiinilisäyksiä (Liite 1: E41–E44). Seosten viskositeettien havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna olevan sitä korkeampia, mitä enemmän piidioksidia niihin oli lisätty (Aerosil Technical Information No. 1279).

Yleiskoneella sekoittamisen, toisin kuin Ultra Turraxilla sekoittamisen, ei esikokeiden perusteella havaittu nostavan seosten lämpötilaa edes maksimisekoitusnopeutta 30 minuutin ajan käytettäessä. Tehosekoittimeen verrattuna yleiskoneen havaittiin puolestaan muodostavan seoksia, joissa ilmakuplien määrä oli vastaavanlaisia,



tehosekoittimella valmistettuja seoksia vähäisempi. Vaikka yleiskoneella selkeästi havaittiinkin olevan muihin sekoitusmenetelmiin nähden joitakin vahvuuksia, arvioitiin geelien nopea valmistuksenjälkeinen synereesi kuitenkin menetelmän heikkoudeksi (Jadhav ym. 2012). Koska organogeelinäytteiden valmistuksessa oli työn esivaatimusten mukaisesti tarkoituksena käyttää minimiprosessointia, päätettiin yleiskone valita varsinaisten organogeelinäytteiden *low shear*-sekoitusmenetelmäksi huolimatta matalilla lesitiinikonsentraatioilla havaitusta nopeahkosta synereesistä.

#### 9.1.5 Sekoitusaika

Sekoituselementtien valinnan lisäksi esikokeissa tutkittiin Ultra Turraxin ja lapasekoittajan sekoitusaikojen vaikutusta organogeelien muodostumisen ja viskositeetin kannalta. Kalaöljylaatua 1 tutkittaessa näytteitä sekoitettiin esikokeissa Ultra Turraxilla 17 000 rpm sekoitusnopeudella käyttäen sekoitusaikoina 2 min ja 5 min pituisia sekoitusaikoja. Sekoitusaikojen ei esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella silmämääräisesti tarkasteltuna havaittu vaikuttavan kalaöljylaatua 1 sisältävien näytteiden muodostumiseen tai viskositeettiin, mutta näytteiden erottumisen havaittiin kuitenkin seurannan aikana tapahtuvan hitaammin pidempiä sekoitusaikoja käytettäessä. Kalaöljylaatujen 2 ja 3 kohdalla kalaöljyn ja 5 % piidioksidiseosten dispergoinnissa käytettiin 30 sekunnin ja 2 minuutin pituisia sekoitusaikoja. Geelien havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna muodostuvan samalla tavalla sekä olevan viskositeettiasteiltaan vastaavanlaisia riippumatta siitä, käytettiinkö sekoituksessa 30 sekunnin vai 2 minuutin pituisia sekoitusaikoja. Kalaöljylaatua 2 sisältävien, 30 sekuntia sekoitettujen, geelien havaittiin kuitenkin olevan väriltään vaaleampia kuin 2 minuuttia sekoitettujen, samaa kalaöljylaatua sisältävien geelien. Lisäksi 30 sekuntia sekoitettujen geelien havaittiin säilytyksen aikana erottuvan nopeammin kuin 2 minuuttia sekoitettujen geelien. Sekoitusajoilla ei Ultra Turraxilla tehtyjen esikokeiden perusteella havaittu siis olevan vaikutusta organogeelien muodostumisen tai viskositeetin kannalta, mutta geelien stabiilisuuksien havaittiin kuitenkin kirjallisuudesta saatujen tietojen kanssa yhdenmukaisesti parantuvan pidempiä sekoitusaikoja käytettäessä (Aerosil Technical Information No. 1279).

Lapasekoittajana toimivan yleiskoneen kohdalla sekoitusaikojen vaikutusta geelien muodostumiseen ja viskositeettiin arvioitiin käyttämällä lesitiinilisäysten jälkeen 2 min, 5 min ja 10 min pituisia sekoitusaikoja. Ennen lesitiinilisäysten suorittamista, kaikkia näytteitä oli esikokeissa piidioksidin asianmukaisen sekoittumisen varmistamiseksi sekoitettu lapasekoittajalla 5 minuutin pituisella sekoitusajalla. Muodostuvien näytteiden havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna olevan viskositeettiasteiltaan vastaavanlaisia, riippumatta niiden sekoituksessa käytetystä ajasta. Pidempään sekoitettujen näytteiden havaittiin kuitenkin sisältävän koostumuksessaan sitä enemmän ilmakuplia sekä olevan ulkonäöltään sitä sameampia, mitä pidempään niiden sekoitusta oli jatkettu. Muodostuvien geelien erottumisessa ei seurannan aikana havaittu eroja erilaisten sekoitusaikojen välillä. Näiden esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa päädyttiin lopulta käyttämään 5 + 5 min pituisia sekoitusaikoja asianmukaisen sekoittumisen ja tasalaatuisten geelien muodostumisen varmistamiseksi.

#### 9.1.6 Lesitiinin määrä

Lesitiinin määrän voidaan esikokeiden ja kirjallisuudesta saatujen tietojen perusteella havaita vaikuttavan kalaöljypohjaisten, piidioksidilla sakeutettujen organogeelien muodostumiseen ja viskositeettiin keskeisesti (Liite 1: E17–E19) (Scartazzini ja Luisi 1988; Willmann ym. 1992). Kun kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviin seoksiin lisättiin esikokeissa noin 0,3 % lesitiiniä, havaittiin seosten sakeutuvan kevyesti, mutta olevan kuitenkin konsistenssiltaan vielä selkeästi valuvia. Kun lisätyn lesitiinin määrää kasvatettiin 0,6 %:iin, havaittiin seosten sakeutuvan geeleiksi, joiden viskositeetti vastasi toivottua. Lesitiinimäärää 0,9 %:iin, 1,3 %:iin ja 1,9 %:iin kasvatettaessa havaittiin geelien viskositeettien edelleen kohoavan, mutta viskositeettimuutosten olevan kuitenkin aiempiin muutoksiin nähden entistä vähäisempiä. Kaikilla kolmella lesitiinimäärityksiin osallistuvalla kalaöljyalaadulla geelien sakeutumisasteiden havaittiin olevan lähes samankaltaisia. Pieniä eroja sakeutumisasteissa oli kuitenkin havaittavissa niin, että kalaöljyalaadun 2 arvioitiin tuottavan kaikista viskoosisimpia geelejä, kun taas kalaöljyalaatua 3 sisältävien geelien arvioitiin olevan konsistenssiltaan vähiten viskooseja. Syytä näytteiden välillä havaittuihin viskositeettieroihin ei vielä tiedetä. On

kuitenkin mahdollista, että kalaöljyalaadun 2 sisältävällä pinta-aktiivisella tokoferolilla olisi vaikutusta kalaöljyalaatua 2 sisältävien näytteiden sakeutumisessa.

Toisessa lesitiinimäärityksessä näytteiden viskositeettien havaittiin kasvavan lesitiinilisäysten myötä jatkuvasti, kunnes lesitiinikonsentraatiolla 3 % näytteiden havaittiin olevan konsistensseiltaan hyvin viskooseja ja paksuja (Liite 1: E8). Kun lesitiinimäärää edelleen kasvatettiin niin, että lisätyn lesitiinin määrä esikokeen lopussa oli 5 %, havaittiin geelien viskositeettien alkavan kuitenkin taas pienentyä. 5 % lesitiiniä sisältävien geelien havaittiinkin muistuttavan konsistensseiltaan ennemmin 0,6 % lesitiiniä sisältäviä pehmeitä geelejä, kuin viskositeeteiltaan paksuja ja kovia 3 % lesitiiniä sisältäviä organogeelejä. Näiden esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella varsinaisten koesarjan organogeeleinäytteiden krilliöljypitoisuuksina päädyttiin käyttämään pitoisuuksia väliltä 0,5–5 %. Muiden lesitiinilaatujen pitoisuudet määritettiin työssä krilliöljyn fosfatidyylikoliinipitoisuuksien mukaisesti niin, että näytteet sisälsivät käytetystä lesitiinilaadusta riippumatta yhtä paljon fosfatidyylikoliinia. Koska tässä työssä organogeeleinäytteiden sakeuttamisessa käytettiin lesitiinin ohella myös kolloidaalista piidioksidia, jäivät työssä testatut krilliöljy- ja lesitiinipitoisuudet useimmissa aikaisemmissa tutkimuksissa käytettyjä lesitiinipitoisuuksia pienemmiksi (Taulukko 5).

#### 9.1.7 Piidioksidin määrä ja laatu

Piidioksidimäärän vaikutusta organogeelien muodostumiseen ja viskositeettiin arvioitiin esikokeissa leikkaavilla terillä varustettua tehosekoitinta ja lapasekoittimen asemassa toimivaa yleiskonetta käytettäessä (Liite 1: E29–E34). Piidioksidipitoisuuksien 1 % ja 3 % ei silmämääräisesti tarkasteltuna havaittu kykenevän geelien muodostukseen edes tapauksissa, joissa kalaöljyä ja piidioksidia sisältäviin seoksiin lisättiin piidioksidin geelilytymistä tehostavaksi komponentiksi 0,7 % lesitiiniä. Lesitiinimäärän lisäyksen ei esikokeiden perusteella havaittu vaikuttavan 3 % piidioksidia sisältävien, lapasekoittajalla sekoitettujen seosten geelilytymiseen edes tilanteissa, joissa seosten lesitiinipitoisuutta kasvatettiin 0,7 %:sta aina 5 % asti. Näiden esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella työn varsinaisten koesarjan organogeeleinäytteiden

valmistuksessa päätettiin lopulta piidioksidin minimipitoisuusvaatimusten mukaisesti käyttää piidioksidin osalta 5 % vakiopitoisuutta.

Piidioksidilaadun vaikutusta organogeelien muodostumiseen ja viskositeettiin tutkittiin esikokeissa yhteensä neljällä erilaisella piidioksidilaadulla (Liite 1: E45–E48). Piidioksidilaadun ei esikokeiden perusteella havaittu vaikuttavan geelien muodostumiseen kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia Ultra Turraxilla 15 000 rpm sekoitusnopeudella sekoitettaessa. Jo kolmen vuorokauden kuluttua seosten valmistuksesta havaittiin kuitenkin Aerosil® 200 Pharmaa, Aerosil® 200 VV Pharmaa sekä Aerosil® 300 Pharmaa sisältävien seosten olevan hydrofobista Aerosil® R972 Pharmaa sisältäviä seoksia sakeampia. Viiden vuorokauden kuluttua seosten valmistuksesta havaittiin Aerosil® 300 Pharmaa sisältävien seosten sakeutuneen edelleen Aerosil® 200 Pharmaa ja Aerosil® 200 VV Pharmaa sisältäviä seoksia sakeammiksi. Nämä esikokeissa tehdyt havainnot erilaisten piidioksidilaatujen välisistä sakeutumiseroista olivat Evonikilta saadun teknisen dokumentaation kanssa yhdenmukaisia (Aerosil Technical Information No. 1281). Evonik toteaa teknisessä dokumentaatioissaan Aerosil® 200 ja 300 Pharman olevan ei-polaaristen liuottimien sakeuttamisessa hydrofobista Aerosil® R972 Pharmaa tehokkaampia sakeuttajia. Polaaristen liuottimien sakeuttamisessa hydrofobisen Aerosil® R972 Pharman on kuitenkin kuvattu toimivan hydrofiilisiä piidioksidilaatuja tehokkaampana sakeuttajana.

Hydrofobisen Aerosil® R972 Pharman havaittiin muista piidioksidilaaduista poiketen muodostavan heti valmistuksen yhteydessä täysin ilmakuplattomia seoksia, mutta myös muiden piidioksidiseosten havaittiin muuttuvan ilmakuplattomiksi noin 3 vuorokauden kuluessa näytteiden valmistuksesta. Hydrofobista Aerosil® R972 Pharmaa sisältävien seosten ilmakuplattomuus johtui todennäköisesti hydrofobisen piidioksidilaadun tehokkaammasta dispergoitumisesta öljyfaasin sekaan (Aerosil Technical Information No. 1281). Koska Aerosil® 200- ja Aerosil® 300- laatujen havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna sakeutuvan säilytyksen aikana Aerosil® R972-laatua tehokkaammin, päätettiin nämä piidioksidilaadut lopulta valita varsinaisten organogeelien koesarjan piidioksidilaaduuksi. Koska Aerosil® 200 VV Pharman ei esikokeissa havaittu eroavan varsinaisesta nestemäisten seosten sakeuttamiseen tarkoitetusta Aerosil® 200-laadusta,

päätettiin se koesarjan laajuuden vuoksi jättää Aerosil® R972 Pharma-laadun lisäksi koesarjan ulkopuolelle (Aerosil Technical Information No. 1281).

#### 9.1.8 Stabiilisuus

Yleisenä johtopäätöksenä näytteiden erottumisen suhteen voidaan Evonikilta saatujen tietojen mukaisesti todeta lasisauvalla ja yleiskoneella sekoitettujen näytteiden erottuneen Ultra Turraxilla sekoitettuja näytteitä nopeammin (Aerosil Technical Information No. 1279). Myös Ultra Turraxin sekoitusajan havaittiin Evonikin tietojen mukaisesti vaikuttavan näytteiden erottumiseen, pidempien sekoitusaikojen hidastaessa erottumista. Lisäksi voidaan todeta, että lesitiinin lisäämisen jälkeen sellaiset kalaöljyalaadut, joissa pelkkä piidioksidilisäys ei itsessään saanut aikaan geelien muodostumista, erottuivat nopeammin kuin näytteet, joissa lesitiinin lisäys toteutettiin jo aikaisemmin geelityneisiin kalaöljyjen ja piidioksidien seoksiin. Niissä Ultra Turraxilla sekoitetuissa näytteissä, joissa geelien havaittiin muodostuvan jo ennen lesitiinilisäyksiä, lesitiinilisäysten havaittiin kuitenkin vähentävän ja/tai hidastavan geelien erottumista. Muiden edellä mainittujen tekijöiden lisäksi näytteiden erottumisen havaittiin hidastuvan myös piidioksidipitoisuuksien kasvaessa johtuen todennäköisesti suurempien piidioksidipitoisuuksien kyvystä kasvattaa organogeelien viskositeettia.

#### 9.2 Organogeelinäytteiden geeliytyminen ja erottuminen

*High shear*-sekoituselementillä sekoitettujen, 5 % piidioksidia sisältävien, G33- ja G34-geelinäytteiden ei useimpien *low shear*-sekoituselementillä sekoitettujen, 5–8 % piidioksidia sisältävien geelinäytteiden tavoin havaittu muodostavan valmistuksen yhteydessä tai työhön kuuluvan 3 kk säilytysajanjakson aikana paksuja ja jähmeitä organogeelejä toivotusti. Poikkeuksena useimmista muista varsinaiseen koesarjaan kuuluvista organogeelinäytteistä, *low shear*-sekoituselementillä sekoitetut G36- ja G37-geelinäytteet muodostivat kuitenkin paksuja organogeelejä valmistuksen yhteydessä odotetusti. Lesitiinilaaduilla 1 ja 6 pienimpien pitoisuustasojen havaittiin työn perusteella sakeuttavan *low shear*-sekoituselementillä sekoitettuja näytteitä ohuiksi ja geelimäisiksi seoksiksi heti valmistuksen yhteydessä, mutta vastaavaa geeliytymistä

valmistuksen yhteydessä ei kuitenkaan ollut havaittavissa suurempia pitoisuustasoja tai muita lesitiinilaatuja käytettäessä. On kuitenkin huomattava, että keskimmäistä pitoisuustasoa käytettäessä näytteet näyttivät silmämääräisesti sakeutuvan geelimäisiksi seoksiksi heti sekoituksen alussa, mutta muuttuvan sekoituksen jatkuessa takaisin valuvaan muotoon. Sitä, johtuuko havaittu vaikutus lesitiinilaatujen hitaasta sekoittumisesta vai mahdollisesta muodostuneen geelirakenteen rikkoutumisesta, ei kuitenkaan vielä tiedetä. Lesitiinilaaduista 1 ja 6 poiketen, lesitiinilaadulla 7 ohuiden geelien havaittiin muodostuvan valmistuksen yhteydessä kaikkia lesitiinin pitoisuustasoja käytettäessä. Kuten lesitiinilaaduilla 1 ja 6, myös lesitiinilaadulla 7, muodostuvien geelien havaittiin kuitenkin koostumuksiltaan olevan näytteiden G36 ja G37 paksuihin organogeeleihin verrattuna huomattavasti ohuempia.

Valmistetuista organogeeelinäytteistä 9 % ja 10 % piidioksidia sisältävät näytteet G37 ja G36 säilyivät toivotunkaltaisina, paksuina geeleinä läpi koko työhön kuuluvan 3 kk säilytysajanjakson. Näytteiden G36 ja G37 lisäksi myös 8 % piidioksidia sisältävä näyte G38 muodosti 3 kk säilytysajanjakson aikana toivotunlaisen, paksun ja jähmeän organogeeelin. Vaikka muiden työssä valmistettujen organogeeelinäytteiden ei säilytysajanjakson jälkeen havaittukaan muistuttavan etukäteisvaatimusten mukaisia, paksuja ja jähmeitä organogeelejä toivotusti, havaittiin näytteiden G1, G21, G24, G27 ja G46 kuitenkin olevan koostumuksiltaan edelleen selkeästi sakeutuneita, ohuita organogeelejä. 7 % piidioksidia sisältävän näytteen G39 havaittiin puolestaan säilytysajanjakson aikana sakeutuvan selkeästi valuvasta nestemäisestä seoksesta näytteiden G1, G21, G24, G27 ja G46 kaltaiseksi ohueksi organogeeleiksi.

Ensimmäisen viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta, oli läpinäkyviin koeputkiin pakatuissa, kiinteitä lääkeaineita sisältävissä lopputuoteformulaatioissa havaittavissa selkeää synereesiä kaikkien muiden geelinäytteiden paitsi näytteiden G11, G14, G36, G37, G42, G46, G48 ja G49 osalta. Näistä geelinäytteistä näytteen G14 havaittiin säilyvän stabiilina 3 viikon ja näytteen G11 4 viikon ajan näytteiden valmistuksesta. Näytteet G36, G37, G42, G46, G48 ja G49 säilyivät työssä stabiileina koko työhön kuuluvan 3 kuukauden säilytysajanjakson ajan.

### 9.3 Reologiset mittaukset

Tässä työssä suoritettujen reologisten mittausten tulosten perusteella on mahdollista arvioida koesarjan mukaisesti valmistettujen organogeelinäytteiden elastisia ja viskoosisia ominaisuuksia, viskositeettia sekä näytteiden stabiilisuutta (TAInstruments AAN016; TAInstruments 2005; Hill 2010). Työssä valmistettujen organogeelinäytteiden ja puhtaan kalaöljyn reologisia ominaisuuksia on kuvattu taulukossa 9. Puhtaalla kalaöljyllä, toisin kuin varsinaisilla koesarjan organogeeleillä, reologisista mittauksista saadut viskositeetin ja kompleksisen leikkausviskositeetin arvot ovat yhdenmukaisia. Tämä johtuu puhtaan, nestemäisen kalaöljyn häviävän pienestä varastomoduulin arvosta, jolla ei pienuutensa vuoksi ole varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden suurempien varastomoduulien arvojen tavoin käytännössä vaikutusta näytteiden kompleksisten leikkausviskositeettien arvoihin (Kaava 1).

Taulukko 9. Työssä valmistettujen organogeelinäytteiden reologisia ominaisuuksia. Geelinäytteiden reologiset ominaisuudet on mitattu dynaamisella rotaatioreometrillä 20 °C lämpötilassa 1 viikon ja näytteistä G1, G36, G45, G46, G47 ja G50 myös 3 kuukauden kuluttua näytteiden valmistuksesta. Varasto- ja häviömoduulien sekä kompleksisen leikkausviskositeetin arvot kuvaavat kyseisten parametrien arvoja kulmataajuuden pisteessä 1,077 rad/s ja viskositeetin arvot vastaavasti viskositeetin arvoja leikkausnopeuden pisteessä 10 1/s. Varastostabiilisuutta kuvaavat myötörajojen arvot on määritetty näytteille venymä-pyyhkäisy-mittauksista saatujen oskilloivien jännitysten ja varastomoduulien arvojen välisenä funktiona. Myötörajojen arvot kuvaavat niitä jännitysten arvoja, joilla varastomoduulien arvot poikkeavat näytteiden lineaarisilta viskoelastisilta alueilta vähintään 10 %. Taulukossa on tummennettuna ne varastomoduulien, häviötangenttien ja viskositeettien arvot, jotka vastaavat vähintään työn perustasoksi määritetyn näytteen G1 vastaavien parametrien arvoja.

Geeli	G' (Pa) (1 vko / 3kk)	G'' (Pa) (1 vko / 3 kk)	Kompleksinen leikkaus- viskositeetti (Pas) (1 vko / 3 kk)	Häviö- tangentti	Visko- siteetti (Pas)	Myötö- raja (Pa)
G1	<b>106,4/</b> 74,22	8,148/ 10,30	<b>99,09/69,56</b>	<b>0,0766/</b> 0,1388	<b>3,967/</b> 2,705	8,128/ 0,4292
G2	13,64	3,579	13,09	0,2624	0,842	~ 0
G3	15,68	4,044	15,03	0,2579	0,840	~ 0
G4	16,83	4,908	16,27	0,2916	0,900	~ 0
G5	33,98	8,185	32,44	0,2049	1,075	0,1977
G6	21,1	5,616	20,27	0,2662	1,488	~ 0
G7	19,81	4,965	18,96	0,2506	0,900	~ 0
G8	23,22	5,232	22,10	0,2253	1,138	~ 0
G9	48,28	10,55	45,88	0,2185	1,823	0,7745
G10	30,86	7,745	29,54	0,2510	0,957	ei määri- tettävissä
G11	<b>119,8</b>	15,75	<b>112,2</b>	0,1315	2,171	1,429
G12	47,67	11	45,42	0,2308	2,185	0,6652
G13	31,43	5,394	29,60	0,1716	0,9865	~ 0
G14	<b>206,3</b>	23,36	<b>192,7</b>	0,1132	2,632	2,877
G15	9,38	5,107	9,914	0,5445	0,704	~ 0
G16	10,8	4,75	10,95	0,4398	0,660	~ 0
G17	13,2	4,754	13,02	0,3602	0,738	~ 0
G18	85,38	4,917	79,39	<b>0,0576</b>	2,995	4,554
G19	37,63	6,433	35,44	0,1710	2,406	~ 0
G20	14,38	5,196	14,20	0,3613	0,8155	~ 0
G21	<b>106,9</b>	12,46	<b>99,90</b>	0,1166	3,345	1,892
G22	18,40	3,94	17,47	0,2141	0,9038	~ 0
G23	57,15	10,47	53,93	0,1832	1,464	0,6287
G24	75,85	2,639	70,45	<b>0,0348</b>	3,282	4,793
G25	23,85	5,959	22,82	0,2499	0,9398	~ 0



G26	<b>226,3</b>	29,85	<b>211,9</b>	0,1320	2,667	2,666
G27	<b>231,1</b>	17,49	<b>215,2</b>	<b>0,0757</b>	<b>5,158</b>	17,97
G28	22,13	5,226	21,11	0,2362	0,8786	~ 0
G29	<b>151,2</b>	18,26	<b>141,4</b>	0,1208	1,924	1,802
G30	7,936	2,865	7,832	0,3610	0,6695	~ 0
G31	8,220	4,329	8,624	0,5266	0,6831	~ 0
G32	6,464	2,443	6,415	0,3779	0,5855	~ 0
G33	<b>162,1</b>	36,99	<b>154,4</b>	0,2282	0,5695	ei määritettävissä
G34	<b>139,7</b>	43,51	<b>135,8</b>	0,3115	0,3908	ei määritettävissä
G35	<b>797,7</b>	144,7	<b>752,6</b>	0,1814	3,795	2,341
G36	<b>3885/7185</b>	637,7/ 636,2	<b>3655/6696</b>	0,1641/ 0,0885	<b>35,21/37,13</b>	22,68/ 43,97
G37	<b>1383</b>	265,1	<b>1308</b>	0,1917	<b>15,60</b>	10,20
G38	<b>655,6</b>	128,7	<b>620,2</b>	0,1963	<b>8,013</b>	3,548
G39	<b>216,0</b>	57,2	<b>207,5</b>	0,2648	3,333	1,275
G40	51,37	14,34	49,51	0,2792	1,237	~0
G41	5,902	3,031	6,159	0,5136	0,6830	~0
G42	<b>145,4</b>	3,096	<b>135</b>	<b>0,0213</b>	<b>4,508</b>	7,478
G43	20,93	4,816	19,94	0,2301	1,924	~0
G44	17,77	4,39	16,99	0,2470	0,8953	~0
G45	<b>163,4/80,72</b>	10,29/ 7,291	<b>152/75,24</b>	<b>0,0630/0,0903</b>	<b>5,348/2,901</b>	4,168/ 1,892
G46	<b>331,9/43,97</b>	11,77/ 4,759	<b>308,3/41,06</b>	<b>0,0355/0,1082</b>	<b>7,346/2,327</b>	6,903/ 2,142
G47	<b>209,5/68,34</b>	8,567/ 4,440	<b>194,7/63,58</b>	<b>0,0409/0,0650</b>	<b>5,789/3,275</b>	19,83/ 2,812
G48	<b>109,2</b>	6,224	<b>101,6</b>	<b>0,0570</b>	<b>4,026</b>	8,570
G49	<b>163,6</b>	4,37	<b>151,9</b>	<b>0,0267</b>	<b>4,960</b>	17,36
G50	<b>224/41,64</b>	14,27/ 7,498	<b>208,3/39,27</b>	<b>0,0637/0,1801</b>	<b>5,036/1,744</b>	16,24/ 1,292
G51	<b>120,7</b>	14,89	<b>112,9</b>	0,1234	3,584	8,119
G52	85,6	19,32	81,46	0,2257	0,8431	0,3866
G53	92,61	20,60	88,08	0,2224	0,7912	0,6214
G54	69,03	16,07	65,79	0,2328	0,6111	0,3077
G55	58,98	13,40	56,14	0,2272	0,5003	0,2363
ÖLJY	0,112	0,4258	0,0409	3,802	0,040	-

Reologisten mittausten varastomoduuli,  $G'$ , kuvaa geelien elastisia ominaisuuksia ja häviömoduuli,  $G''$ , puolestaan geelien viskoosia osuutta (Hill 2010; Simonen 2011). Mitä suurempia näytteille saadut varastomoduulien arvot ovat, sitä elastisemmista/paksummista näytteistä on pääsääntöisesti kyse. Taulukossa 9 näytteiden

varasto- ja häviömoduulien arvot on esitetty kulmataajuuden pisteessä 1,077 rad/s, yleisesti käytetyn kulmataajuuden pisteen 10 rad/s osuessa osalla näytteistä niiden lineaaristen viskoelastisten alueiden ulkopuolelle. Koska tämän työn tarkoituksena oli saada aikaan jähmeitä, jopa hieman pastamaisia, paksuhkoja lopputuotteita, olivat suuret varastomoduaalien arvot yleisesti ottaen lopputuotteiden kannalta toivottuja. Suurten varastomoduaalien arvojen lisäksi myös varsinaisten viskositeettien korkeat arvot nähtiin työssä valmistettujen organogeelien kannalta toivottuina.

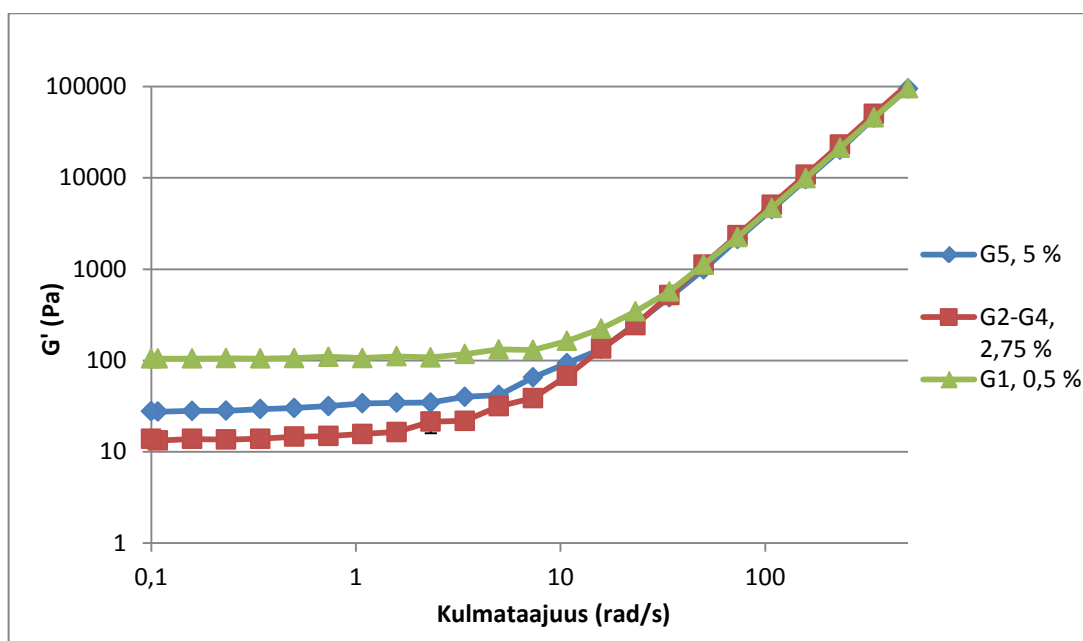
Organogeelinäytteiden häviötangenttien avulla on mahdollista kuvata näytteiden viskoosisten ja elastisten ominaisuuksien välistä suhdetta, pienten häviötangenttien arvojen indikoidessa näytteiden elastisuutta (Korhonen 2003). Pienet häviötangenttien arvot ovat suurten varastomoduaalien ja viskositeettien arvojen lisäksi näin ollen tämän työn kannalta toivottuja. Pienimmät häviötangenttien arvot voidaan taulukon 9 perusteella havaita odotetusti näytteillä G1, G18, G24, G27, G42 ja G45–G50. Hieman yllättäen näytteen G36 häviötangentin arvo jää kuitenkin suuresta häviömoduulin arvosta johtuen selkeästi esimerkiksi näytteiden G1 ja G18 häviötangenttien arvoja suuremmaksi.

Tässä työssä organogeelinäytteiden valmistuksessa päädyttiin lopulta käyttämään piidioksidilaatujen osalta kahta eri piidioksidilaatua ja pinta-aktiivisten aineiden osalta yhteensä seitsemää eri laatua. Seuraavassa on kulmataajuuden funktiona esitetty erilaisten pinta-aktiivisten aineiden ja piidioksidien laatujen ja pitoisuuksien vaikutus organogeelinäytteiden varastomoduaalien arvoihin, kun organogeelinäytteiden varastomoduaalien arvot on kulmataajuuden funktiona määritetty jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä (Kuvat 7–20).

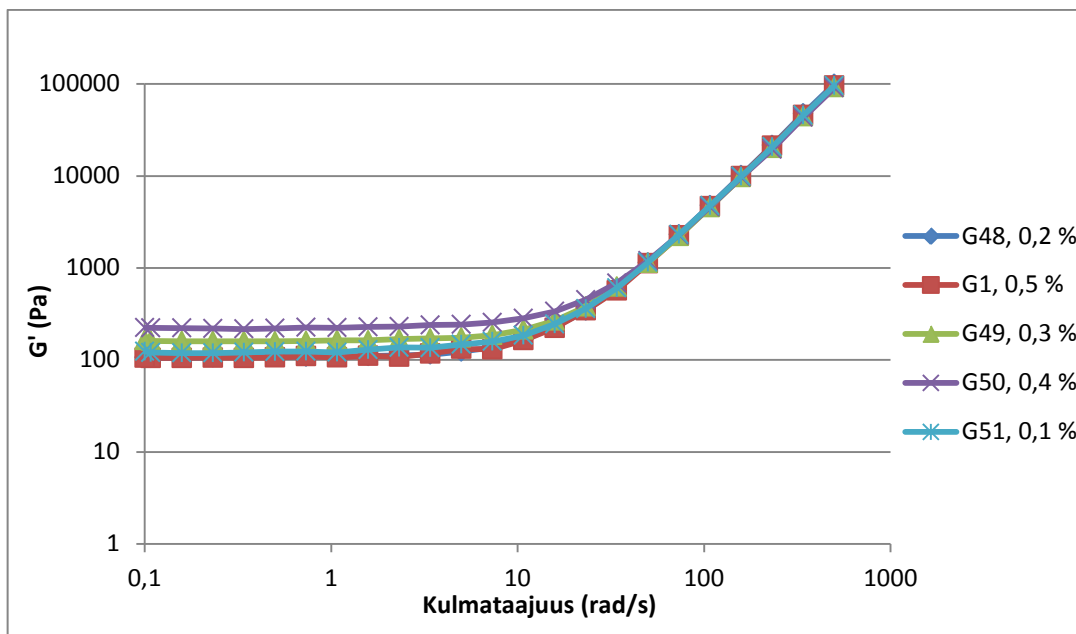
### 9.3.1 Krilliöljy

Kuten kuvasta 7 voidaan havaita, käyttäytyvät lesitiinilaatua 1 sisältävät näytteet suurilla kulmataajuuksien arvoilla yhdenmukaisesti. Eroja näytteiden varastomoduaalien arvoissa on kuitenkin lesitiinilaadun pitoisuuden perusteella havaittavissa pieniä kulmataajuuksien arvoja käytettäessä. Pienten, 0,5 %, lesitiinipitoisuuksien voidaan

reologisten mittausten tulosten perusteella havaita sakeuttavan kalaöljypohjaisia seoksia suurempia, 2,75 % tai 5 %, lesitiinipitoisuuksia tehokkaammin lesitiinilaatua 1 pinta-aktiivisena aineena käytettäessä (Kuva 7; Taulukko 9). Taulukon 9 varastomoduulien ja viskositeettien arvoista on lisäksi havaittavissa, että kaikista korkein, 5 %, pitoisuustaso sakeutti näytteseoksia keskisuurta, 2,75 %, pitoisuustasoa tehokkaammin, minkä perusteella lesitiinilaadun 1 sakeuttavien ominaisuuksien voidaan arvioida käyttäytyvän pitoisuuden suhteen epälineaarisesti. Näiden havaintojen perusteella työssä päätettiin lesitiinilaadun 1 mahdollisen optimipitoisuusalueen määrittämiseksi valmistaa muutamia ylimääräisiä geelinäytteitä lesitiinipitoisuuksilla 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % ja 0,4 % (Kuva 8; Taulukko 9).



Kuva 7. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,5–5 % lesitiinilaatua 1 sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

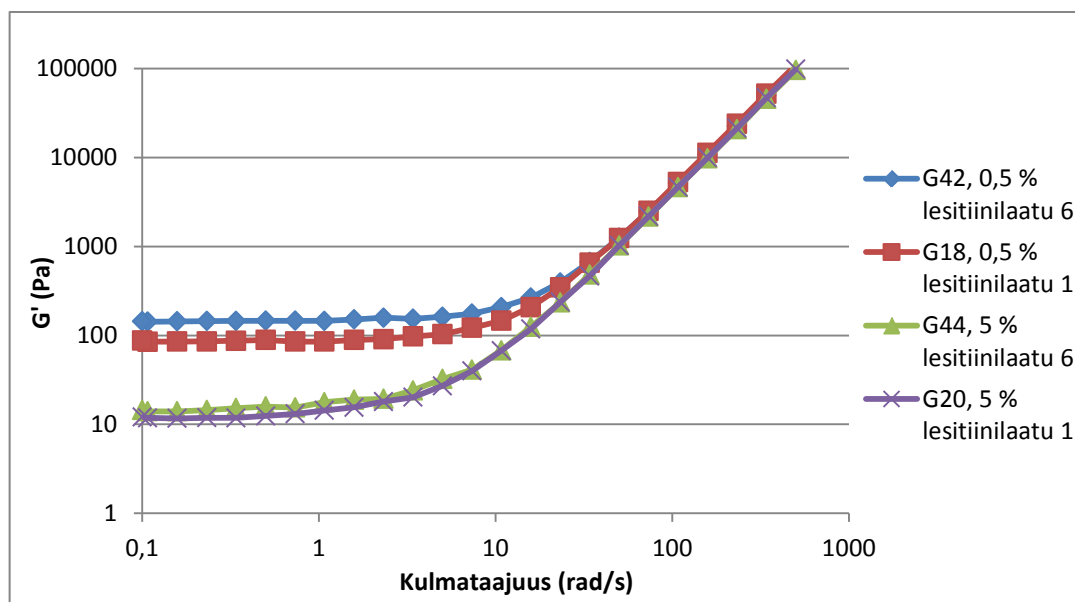


Kuva 8. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,1–0,5 % lesitiinilaatua 1 sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

Lesitiinilaadun 1 voidaan reologisista mittauksista saatujen tulosten perusteella havaita sakeuttavan 5 % piidioksidia sisältäviä näytteitä myös hyvin matalilla, 0,1 %, pitoisuustasoilla (Kuva 8; Taulukko 9). Näytteiden sakeutumistasojen havaittiin tulosten perusteella olevan suurimmillaan lesitiinilaadun pitoisuustasolla 0,4 %. Vaikka reologisten mittausten elastisten moduulien ja kompleksisten leikkausviskositeettien arvojen perusteella 0,1 % pitoisuustaso saikin 0,2 % pitoisuustasoon nähden aikaan aiempaa elastisempien ja paksumpien näytteiden muodostumista, on kuitenkin huomattava, että varsinaisten viskositeettien arvojen perusteella näytteiden elastisuus ja paksuus kasvoivat kuitenkin odotetusti päinvastaisessa järjestyksessä (Taulukko 9).

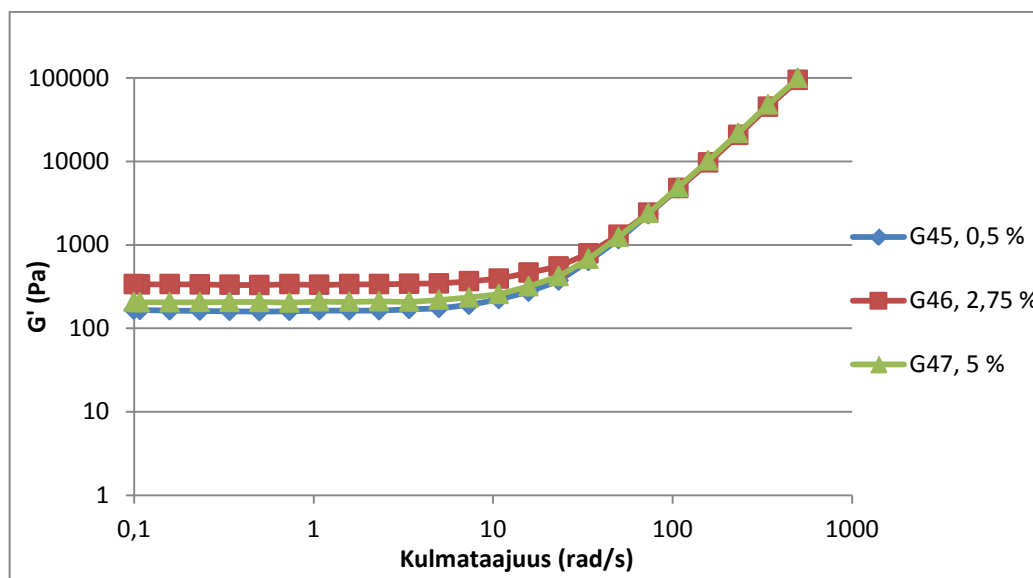
Optimipitoisuusalueen määrittämisen lisäksi työssä päätettiin esikokeissa käytetyn lesitiinilaadun 5 silmämääräisesti voimakkaamman sakeuttavan vaikutuksen vuoksi tutkia organogeelinäytteiden sakeuttamisessa pullotetun lesitiinilaadun 1 lisäksi ylimääräisinä näytteinä myös kahta muuta krilliöljylaatua (Taulukko 8). Ylimääräisissä näytteissä krilliöljylaatuna käytettiin Olympic Clinicians-krilliöljykapseleita (lesitiinilaatu 7) sekä pullotetun lesitiinilaadun 1 toista osanäytettä (lesitiinilaatu 6). Reologisten mittausten tulosten perusteella lesitiinilaadun 6 voidaan pienimmällä 0,5 %

pitoisuustasolla havaita olevan sekä näytteiden viskositeettien että elastisten moduulien arvojen perusteella lesitiinilaatua 1 aavistuksen tehokkaampi sakeuttaja (Kuva 9; Taulukko 9). Suurimpia pitoisuustasoja käytettäessä lesitiinilaatujen 1 ja 6 havaittiin kuitenkin sakeuttavan näytteitä yhtä tehokkaasti.



Kuva 9. 5 % Aerosil® 300:aa ja 0,5–5 % lesitiinilaatua 1 ja 6 sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

Reologisten mittausten tulosten perusteella krilliöljykapseleiden sisältämän lesitiinilaadun 7 voidaan esikokeissa tehtyjen havaintojen mukaisesti arvioida sakeuttavan 5 % piidioksidia sisältäviä näytteitä pullotettuja lesitiinilaatuja 1 ja 6 tehokkaammin (Kuva 10; Taulukko 9). Tehokkaamman sakeutumisasteen lisäksi lesitiinilaadun 7 voidaan havaita eroavan lesitiinilaaduista 1 ja 6 myös erilaisten pitoisuustasojen aikaansaamien sakeutumisasteiden perusteella (Kuva 7; Kuva 9; Kuva 10; Taulukko 9). Lesitiinilaaduista 1 ja 6 poiketen, lesitiinilaadun 7 havaittiin reologisten mittausten tulosten perusteella sakeuttavan 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia esikokeissa havaitun lesitiinilaadun 5 tavoin tehokkaimmillaan keskimmäistä pitoisuustasoa käytettäessä.

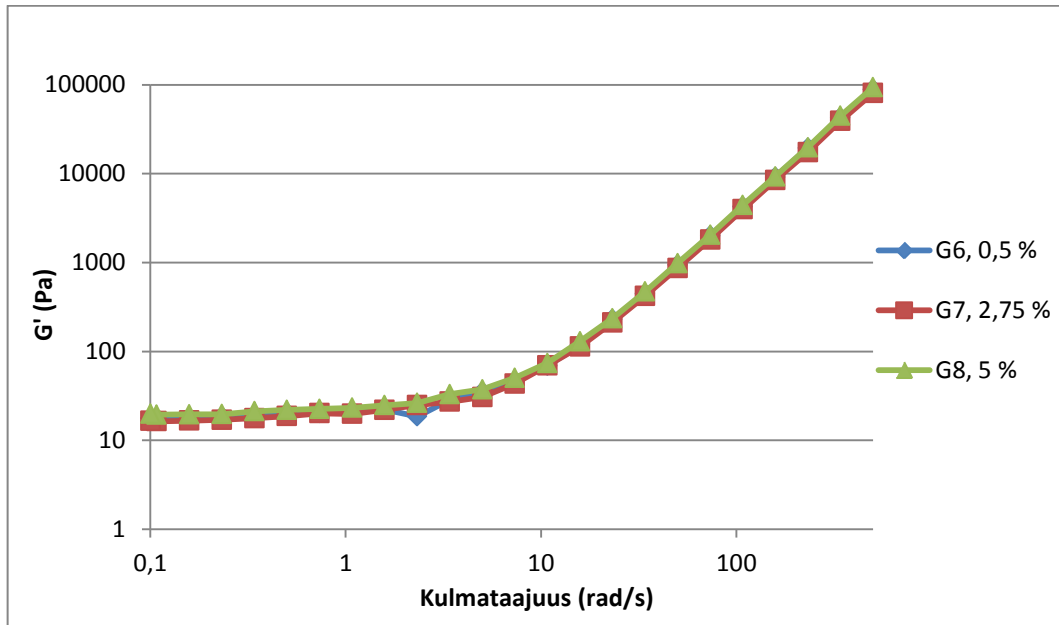


Kuva 10. 5 % Aerosil® 300:aa ja 0,5–5 % lesitiinilaatua 7 sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

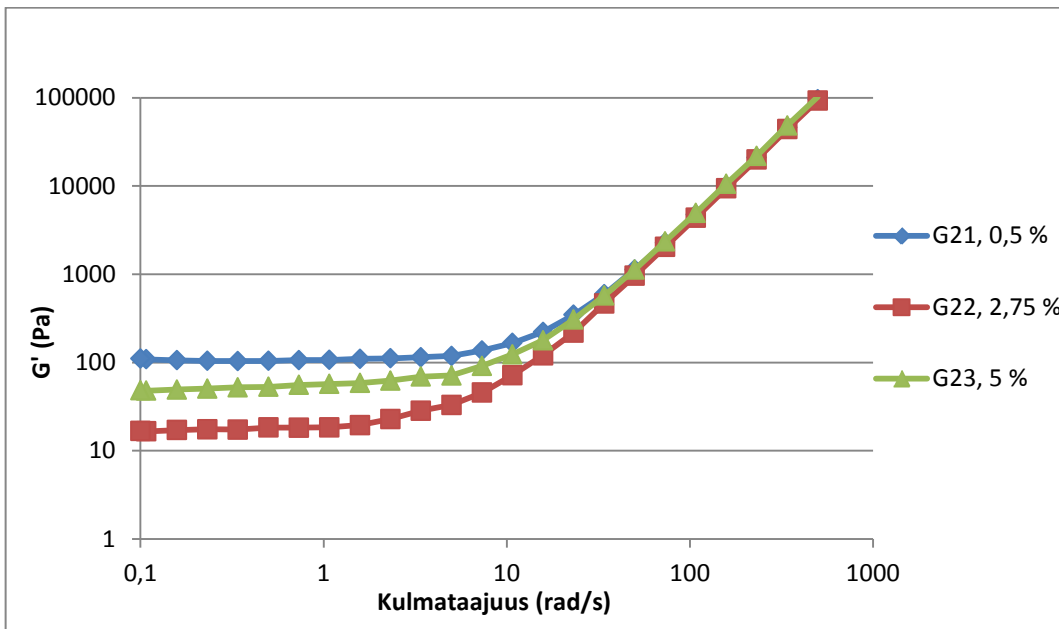
### 9.3.2 Muut lesitiinilaadut

Alla kuvien 11, 13 ja 14 avulla esitettyjen varastomoduulien arvojen perusteella lesitiinilaatujen Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA voidaan suurimmilla pitoisuustasoillaan havaita sakeuttavan kalaöljyä ja Aerosil® 200:aa sisältäviä seoksia lesitiinilaatua Phosal® 35 SB tehokkaammin (Kuva 11; Kuva 13; Kuva 14). On kuitenkin huomattava, että Aerosil® 200-laadun tilalla Aerosil® 300-laatua käytettäessä, on muiden Phosal®-laatujen lisäksi mahdollista sakeuttaa myös lesitiinilaatua Phosal® 35 SB sisältäviä seoksia (Kuva 12; Taulukko 9). Phosal® 35 SB:tä sisältävien seosten erilaisten sakeutumisasasteiden lisäksi Aerosil® 200:aa ja Aerosil® 300:aa sisältävien näytteiden voidaan havaita eroavan toisistaan myös erilaisten pitoisuustasojen aikaansaamien sakeutumisasasteiden perusteella (Taulukko 9). Aerosil® 200:n voidaan reologisten mittausten tulosten perusteella havaita saavan Phosal® 53 MCT:n ja Phosal® 75 SA:n kanssa aikaan seoksia, joiden sakeutumisasaste on viskositeettiarvojen perusteella suurimmillaan suurinta pitoisuustasoa käytettäessä ja pienimmillään keskimmäistä pitoisuustasoa käytettäessä. Aerosil® 300:aa sisältävien näytteiden sakeutumisasasteiden on puolestaan viskositeettiarvojen perusteella havaittu olevan suurimmillaan pienintä pitoisuustasoa käytettäessä ja pienimmillään Aerosil® 200:n tavoin keskimmäistä pitoisuustasoa käytettäessä. Reologisten mittausten tulosten

perusteella näytteiden elastisten moduulien havaittiin kuitenkin viskositeettiarvoista poiketen saavan lesitiinilaatujen välillä aikaan erisuuruisia ja viskositeettiarvojen mukaisesta järjestyksestä poikkeavia arvoja (Taulukko 9).

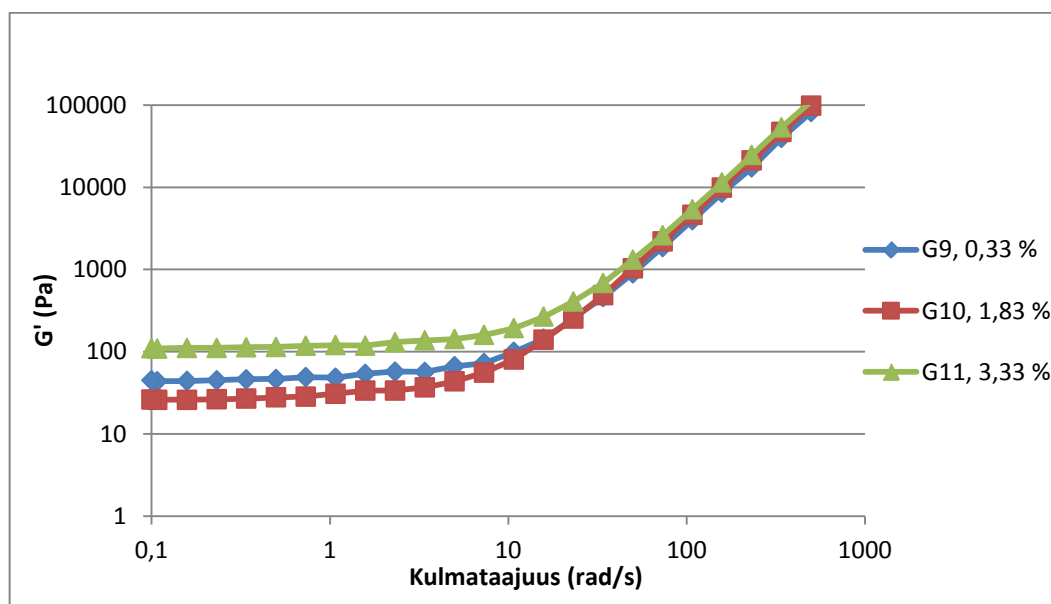


Kuva 11. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,5–5 % Phosal® 35 SB:tä sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.



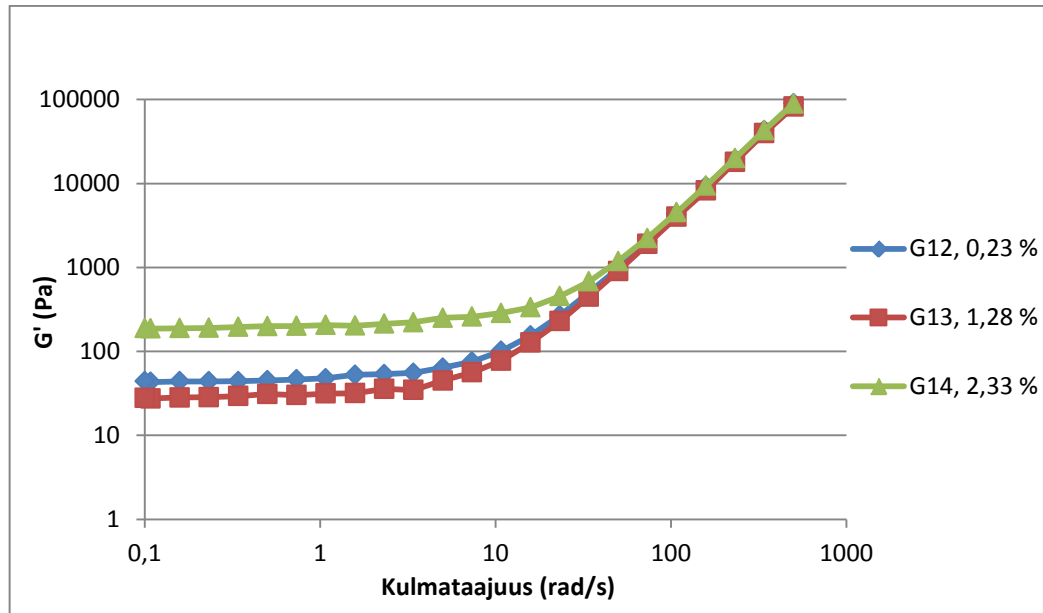
Kuva 12. 5 % Aerosil® 300:aa ja 0,5–5 % Phosal® 35 SB:tä sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

Reologisten mittausten tulosten perusteella Aerosil® 200:aa ja Phosal® 53 MCT:tä tai Phosal® 75 SA:ta sisältävien näytteiden voidaan Aerosil® 300-laadusta poiketen havaita käyttäytyvän sakeutumisasteiltaan yhdenmukaisesti (Taulukko 9). Yhdenmukaisuudesta poiketen Phosal® 75 SA:n voidaan kuitenkin suurimmalla pitoisuustasollaan havaita muodostavan Phosal® 53 MCT:tä elastisempia ja paksumpia näytteseoksia. Pinta-aktiivisten aineiden pitoisuuksien aikaansaamissa sakeutumisasteissa, Aerosil® 200-laadulla voidaan havaita sekä lesitiinilaadun 1 että lesitiinilaatujen Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA osalta samansuuntaista epälineaarista käyttäytymistä, jonka mukaan komponenttien keskimäinen pitoisuustaso toimisi pinta-aktiivisesta aineesta riippumatta näytteiden heikoimpana sakeuttajana. Erona erilaisten lesitiinilaatujen pitoisuuksien aikaansaamissa sakeutumisasteissa on kuitenkin se, että lesitiinilaadun 1 kohdalla parhaimpaan sakeutumisasteeseen päästiin pienimmällä pitoisuustasolla, kun taas Phosal® 53 MCT:n ja Phosal® 75 SA:n kohdalla paras sakeutumisaste saatiin aikaan suurimmalla pitoisuustasolla. Aerosil® 200-laadusta poiketen Aerosil® 300-laadun osalta suurimmat viskositeettiärvot saatiin reologisten mittausten tulosten perusteella lesitiinilaatujen 1 ja 6 tavoin aikaan Phosal® 53 MCT:n ja Phosal® 75 SA:n pienimmillä pitoisuustasoilla.



Kuva 13. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,33–3,33 % Phosal® 53 MCT:tä sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.





Kuva 14. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,23–2,33 % Phosal® 75 SA:ta sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

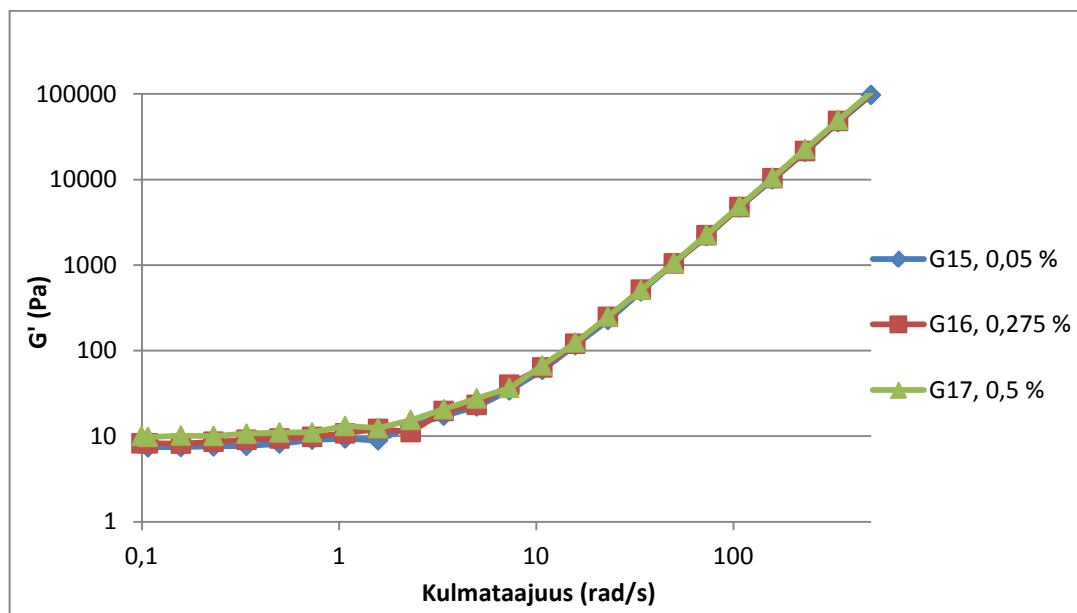
Yksittäisiä poikkeuksia lukuun ottamatta Phosal® 53 MCT:n ja Phosal® 75 SA:n voidaan reologisten mittausten tulosten perusteella havaita kykenevän lesitiinilaadun 1 pienimmän pitoisuustason kanssa lähes vastaavankaltaisiin sakeutumisasteisiin piidioksidilaadusta riippuen joko Phosal®-laatuojen pienimpiä tai suurimpia pitoisuustasoja käytettäessä (Taulukko 9). Vaikka reologisissa mittauksissa viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta, saatiinkin Phosal® 53 MCT:llä ja Phosal® 75 SA:lla lesitiinilaadun 1 kanssa aikaan hyvin samankaltaisia tuloksia, on kuitenkin huomattava, että heti valmistuksen jälkeen lesitiinilaatua 1 sisältävien näytteiden havaittiin silmämääräisesti tarkasteltuna olevan selkeästi molempia Phosal®-laatuja sisältäviä näytteitä sakeampia.

Luvussa 5.2.2 on kuvattu lesitiiniä sisältävien organogeelien muodostumista ja viskositeettia polaaristen liuottimien osuuksien funktiona (Kuva 4). Lesitiiniorganogeelien viskositeettien on Vintilojun ja Lerouxin (2008) mukaan havaittu kasvavan nopeasti ja jyrkästi polaaristen liuottimien kriittisten pitoisuuksien lisäysten yhteydessä, mutta putoavan tämän jälkeen nopeasti polaaristen liuottimien osuuksien kasvaessa. Mikäli piidioksidin ajatellaan sen pinnan silanoliryhmien vetysidosten muodostamiskyvyn perusteella toimivan näytteissä polaarisen liuottimen asemassa,

voidaan lesitiiniä ja piidioksidia sisältävien seosten käyttäytymisen havaita eroavan luvussa 5.2.2 esitetystä lesitiiniorganogeealien käyttäytymisestä selkeästi (Taulukko 9). Tässä työssä valmistettujen, erilaisia Phosal®-laatuja sisältävien näytteseosten sakeutumisasteiden on luvusta 5.2.2 ja kuvasta 4 poiketen havaittu olevan suurimmillaan piidioksidin osuuksien ääripäissä ja pienimmillään piidioksidin keskimmaisilla pitoisuustasoilla.

### 9.3.3 Tokoferoli

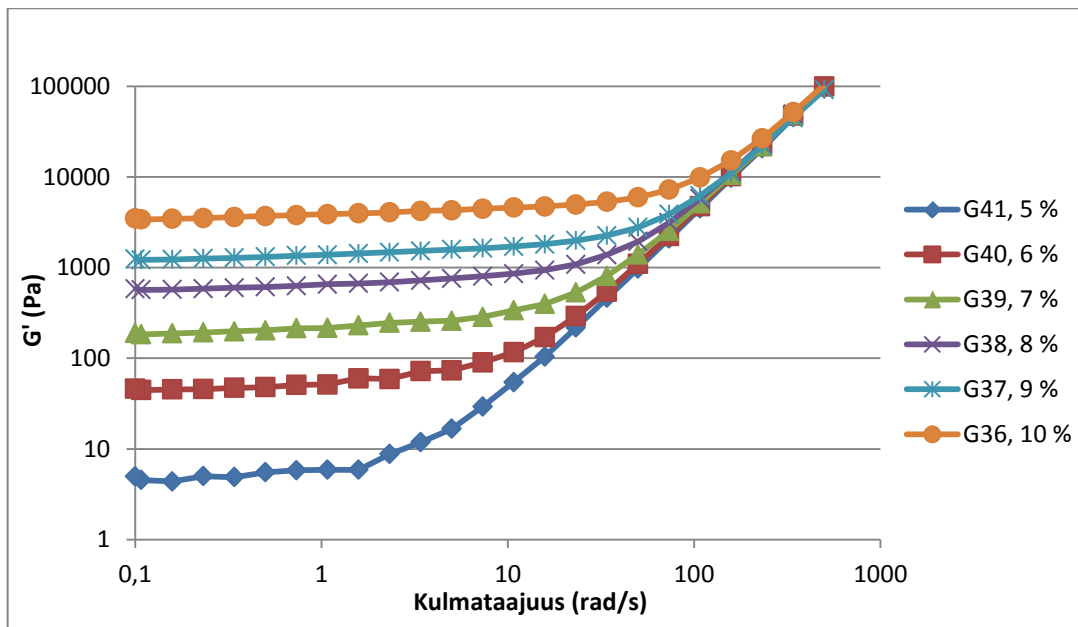
Kuten kuvasta 15 ja taulukosta 9 voidaan havaita, näyttäisi tokoferoli tämän työn perusteella olevan 5 % piidioksidia sisältävien kalaöljypohjaisten seosten sakeuttamisessa muita työssä käytettyjä pinta-aktiivisia aineita heikompi sakeuttaja. Taulukosta 9 on lisäksi tokoferolin osalta havaittavissa tokoferolia sisältävien näytteiden elastisten ja viskoosisten moduulien väliset pienet erot, jotka edelleen selittävät näytteille saatuja epätavallisen suurehkoja häviötangenttien arvoja. Tokoferolin osalta Aerosil®-laaduilla ei reologisten mittausten tulosten perusteella havaittu olevan vaikutusta näytteiden viskoelastisten ominaisuuksien kannalta.



Kuva 15. 5 % Aerosil® 200:aa ja 0,05–0,5 % tokoferolia sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

### 9.3.4 Piidioksidin määrä

Vertailun vuoksi työssä suoritettiin reologiset mittaukset myös *low shear*-menetelmällä valmistetuille, 5–10 % piidioksidia sisältäville geelinäytteille G36–G41 (Kuva 16; Taulukko 9). Reologisten mittausten tulosten perusteella pelkkää 5 % piidioksidia sisältävien organogeelinäytteiden havaittiin olevan viskoelastisilta ominaisuuksiltaan heikompia, kuin näytteiden, joihin 5 % piidioksidin lisäksi oli lisätty pinta-aktiivisiksi aineiksi joko krilliöljyä tai lesitiiniä (Taulukko 9). Tokoferolia sisältävien näytteiden viskoelastisten ominaisuuksien havaittiin työn perusteella muistuttavan pelkkää 5 % piidioksidia sisältävien näytteiden viskoelastisia ominaisuuksia.



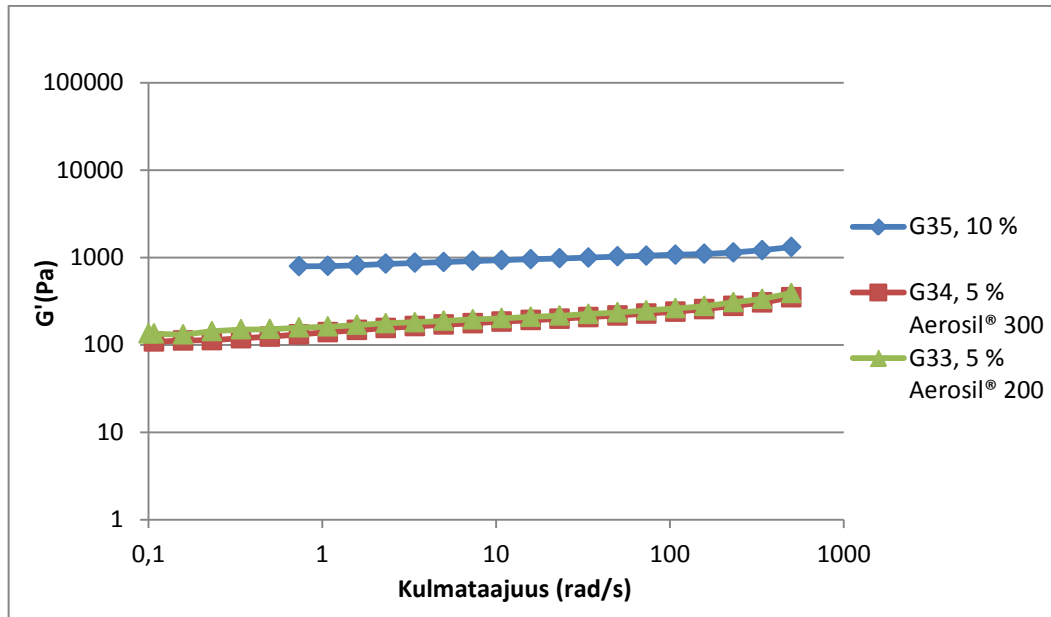
Kuva 16. 5–10 % Aerosil® 200:aa sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

On kuitenkin huomattava, että piidioksidin sakeutumista tehostavat ominaisuudet jäivät useimmilla työssä käytetyillä pinta-aktiivisilla aineilla erilaisista pitoisuustasoista huolimatta niin alhaisiksi, ettei seosten lisäyksistä huolimatta havaittu geelilytyvän kunnolla, vaan muistuttavan viskoelastisilta ominaisuuksiltaan 5–7 % piidioksidia sisältäviä, ohuita seoksia (Taulukko 9). Tokoferolista ja useimmista lesitiinilaatujen pitoisuustasoista poiketen, pienimpien krilliöljypitoisuuksien ja piidioksidilaadusta riippuen joko suurimpien tai pienimpien lesitiinipitoisuuksien, havaittiin kuitenkin

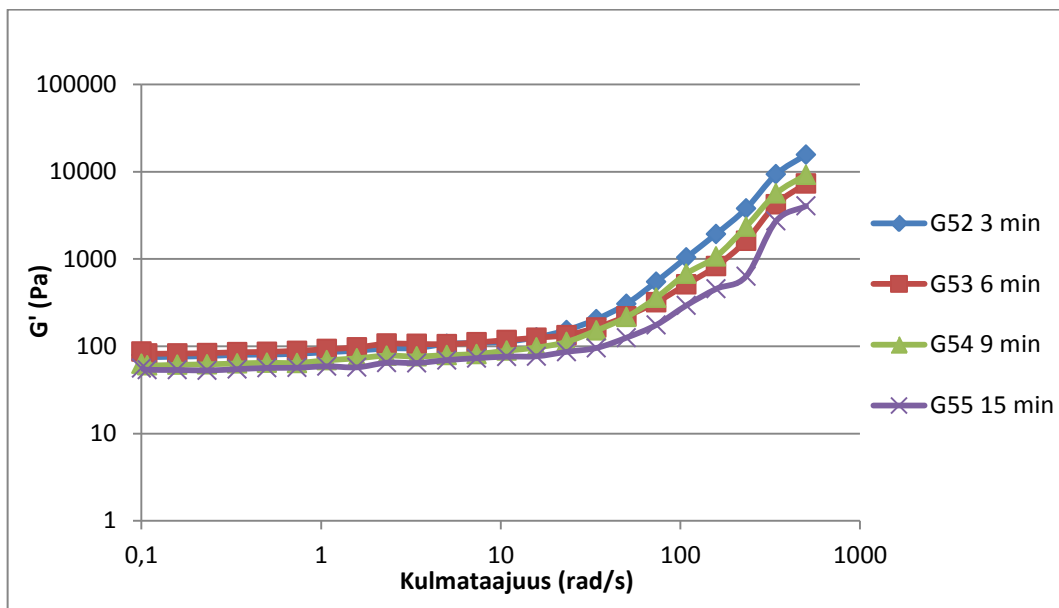
sakeuttavan *low shear*-sekoitettuja seoksia ohuiksi geeleiksi. Lesitiinilaadulla 5 *low shear*-sekoitettujen seosten sakeutumisvaikutus oli esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella muita lesitiinilaatuja selkeämpi. Pelkkää piidioksidia sisältävien seosten voitiin reologisten mittausten tulosten perusteella havaita odotetusti olevan sitä paksumpia, elastisempia ja stabiilimpia, mitä enemmän piidioksidia niiden valmistuksessa oli käytetty (Kuva 16; Taulukko 9) (Aerosil Technical Information No. 1279). Piidioksidipitoisuuksien 9 % ja 10 % havaittiin työssä sekä silmämääräisesti että reologisten mittausten tulosten perusteella saavan aikaan toivotunlaisten, paksujen ja jähmeiden lopputuotteiden muodostumista.

### 9.3.5 Sekoituselementti

*High shear*-sekoituselementillä sekoitettujen, pelkkää piidioksidia sisältävien, geelinäytteiden havaittiin työssä tehtyjen reologisten mittausten tulosten perusteella olevan odotetusti sitä sakeampia mitä enemmän piidioksidia niiden valmistuksessa oli käytetty (Kuva 17; Taulukko 9) (Aerosil Technical Information No. 1279). Piidioksidilaadun ei piidioksidipitoisuuden tavoin havaittu vaikuttavan *high shear*-sekoituselementillä sekoitettujen, 5 % piidioksidia sisältävien geelinäytteiden viskoelastisiin ominaisuuksiin keskeisesti, Aerosil® 200:aa sisältävien geelinäytteiden ollessa Aerosil® 300:aa sisältäviin geelinäytteisiin verrattuna vain aavistuksen paksumpia. Yhden viikon mittauspisteessä suoritettujen reologisten mittausten tulosten perusteella piidioksidilaadun lisäksi myöskään sekoitusaika ei vaikuttanut 5 % piidioksidia sisältävien geelinäytteiden viskoelastisiin ominaisuuksiin merkittävästi (Kuva 18; Taulukko 9). Muista reologisista parametreista poiketen näytteiden varsinaisten viskositeettien arvojen havaittiin kuitenkin reologisten mittausten tulosten perusteella pienenevän sekoitusaikojen kasvaessa johdonmukaisesti (Taulukko 9). Erot näytteiden viskositeettiarvojen välillä olivat kuitenkin pieniä ja näin ollen tulosten kannalta käytännössä merkityksettömiä. Alla on kulmataajuuden funktiona esitetty *high shear*-sekoituselementillä sekoitettujen, 5–10 % piidioksidia sisältävien geelinäytteiden varastomoduulien arvoja jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna (Kuva 17; Kuva 18).



Kuva 17. *High shear*-sekoituselementillä sekoitettujen 5-10 % piidioksidia sisältävien näytteiden G33–G35 varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.



Kuva 18. Sekoitusajan vaikutus *high shear*-sekoituselementillä sekoitettujen näytteiden varastomoduulien arvoihin 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

Varmaa syytä sille, miksi reologisten mittausten varastomoduulien ja kompleksisten leikkausviskositeettien arvot poikkesivat toistensa kanssa yhdenmukaisten geelinäytteiden G33 ja G55 välillä niin voimakkaasti ei vielä tiedetä (Taulukko 9). On

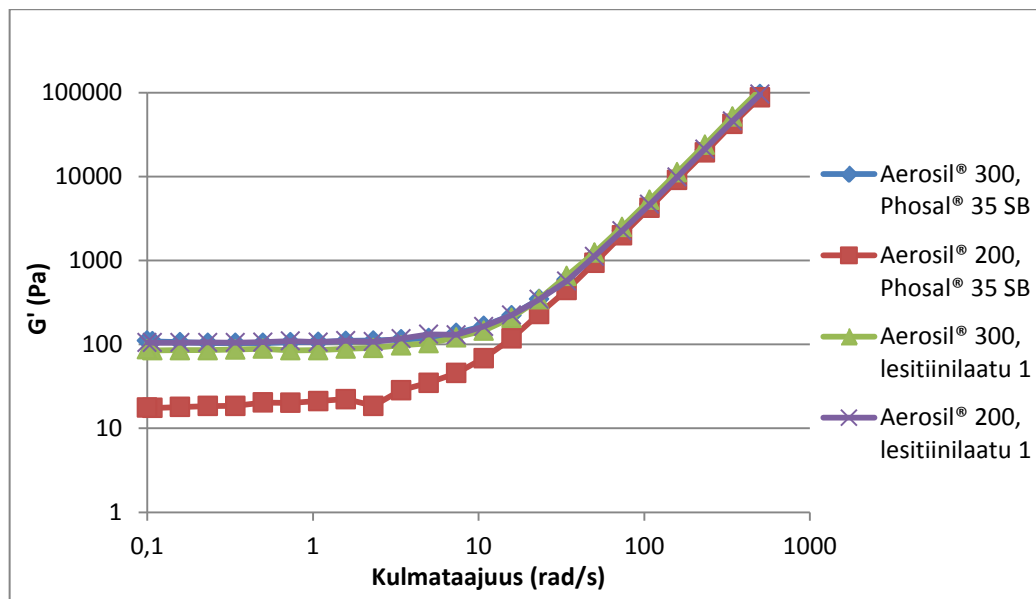
kuitenkin mahdollista, että useista toistomittauksista huolimatta, joko reologisten mittausten käytännön suorittamisessa tai itse näytteiden valmistuksessa on voinut esiintyä joitakin poikkeavaisuuksia, jotka sittemmin olisivat selittäneet näytteille G33 ja G34 reologisista mittauksista saatuja, silmämääräiseen tarkasteltuun nähden epäjohdonmukaisia tuloksia.

Kuvissa 16 ja 18 esitettyjen reologisten mittausten tulosten perusteella *high shear*-sekoitusmenetelmän voidaan Evonikilta saatujen tietojen mukaisesti havaita parantavan 5 % piidioksidia sisältävien näytteiden stabiilisuutta *low shear*-sekoitusmenetelmään verrattuna merkittävästi (Aerosil Technical Information No. 1279). *High shear*-sekoituksen stabiloivan vaikutuksen voidaan seosten varastomoduulien arvojen perusteella pääsääntöisesti havaita olevan lähes kaikkia yksittäisiä pinta-aktiivisten aineiden lisäyksiä merkittävämpi (Kuvat 7–15; Kuva 18). On kuitenkin huomattava, että piidioksidipitoisuudella 10 % *high shear*-sekoitettujen seosten voitiin paremmasta stabiilisuudestaan huolimatta havaita olevan viskoelastisilta ominaisuuksiltaan vastaavanlaisia, *low shear*-sekoitettuja seoksia selkeästi ohuempia (Kuva 16; Kuva 17; Taulukko 9). Varmaa syytä sekoitusvoimakkuuden erilaiseen vaikutukseen 10 % piidioksidia sisältävien näytteiden välillä ei vielä tiedetä, mutta erilaisen käyttäytymisen voidaan arvioida johtuvan *high shear*-sekoituksen korkeammasta, mahdollisesti geelien kolmiulotteisen rakenteen rikkovasta sekoitusvoimasta.

### 9.3.6 Piidioksidilaatu

Tässä työssä tehtyjen reologisten mittausten tulosten perusteella piidioksidilaatujen Aerosil® 200 ja Aerosil® 300 voidaan havaita eroavan toisistaan sakeuttamisominaisuuksiensa perusteella (Taulukko 9). Reologisista mittauksista saatujen tulosten perusteella piidioksidilaatujen sakeuttamisasteiden vaihtelu erilaisten pinta-aktiivisten aineiden pitoisuustasojen välillä ei kuitenkaan tapahdu aina samansuuntaisesti. Kuvassa 19 on esitetty Aerosil®-laatujen varastomoduulien arvojen välisiä eroja lesitiinilaatua 1 ja Phosal® 35 SB sisältävissä organogeelinäytteissä. Aerosil® 300-laadun voidaan kuvan 19 perusteella havaita sakeuttavan 0,5 % Phosal® 35 SB:tä sisältäviä näytteitä Aerosil® 200-laatua tehokkaammin. Lesitiinilaadun 1

kohdalla ero Aerosil®-laatuojen välillä ei ole yhtä selkeää, mutta reologisten mittausten tulosten perusteella Aerosil® 200-laadun voidaan kuitenkin Aerosil® 300-laatuun verrattuna havaita saavaan lesitiinilaadun 1 kanssa aikaan aavistuksen sakeampia seoksia. Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee ei-polaaristen liuottimien sakeuttamiseen Aerosil®-laaduista ensisijaisesti Aerosil® 300:aa, joten tulos Aerosil® 200-laadun paremmasta sakeuttavasta vaikutuksesta on valmistajalta saatujen tietojen kanssa ainakin osittain ristiriitainen (Aerosil Technical Information No. 1281).



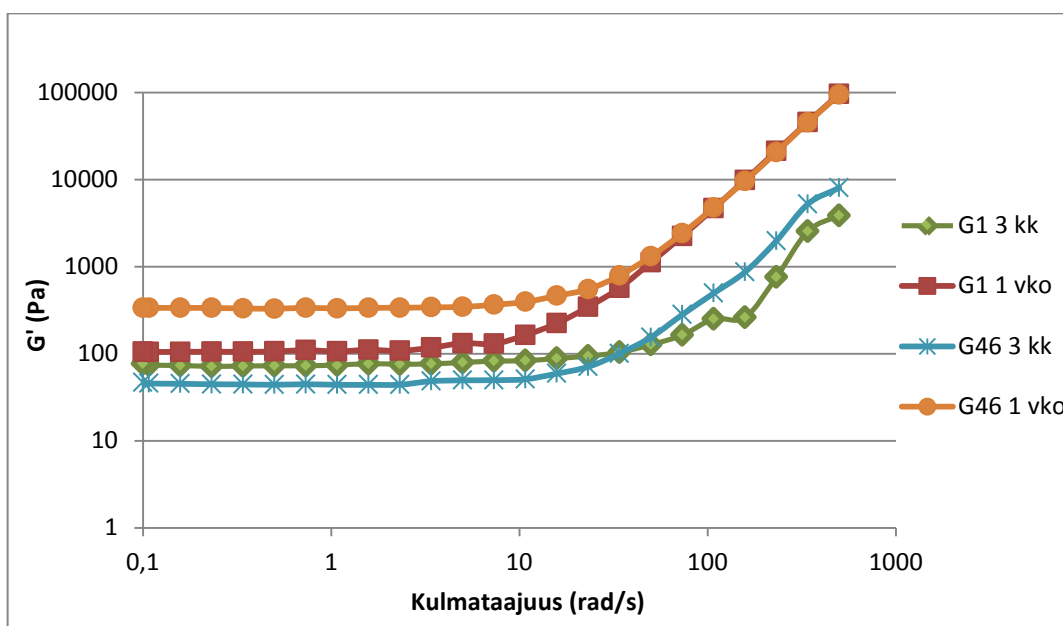
Kuva 19. 5 % piidioksidia ja 0,5 % lesitiinilaatua 1 tai Phosal® 35 SB:tä sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.

Vaikka Aerosil® 300:n havaittiinkin työssä tehtyjen reologisten mittausten tulosten perusteella olevan lesitiinilaatua 1 sisältävien näytteiden sakeuttamisessa aavistuksen Aerosil® 200-laatua heikompi sakeuttaja, kykeni Aerosil® 300 kuitenkin muiden lesitiinilaatuojen pienimpien ja suurimpien pitoisuustasojen kanssa pääsääntöisesti Aerosil® 200:aa tehokkaampiin sakeutumisasteisiin (Taulukko 9). Taulukon 9 tuloksissa on kuitenkin 5 % Aerosil® 300:aa ja 2,75 % lesitiinilaatua 1 sisältävän näytteen G19 kohdalla havaittavissa sekä reologisten mittausten tulosten perusteella että silmämääräisesti tarkasteltuna selkeää epäjohdonmukaisuutta, Aerosil® 200:aa sisältävien näytteiden G2–G4 ollessa näytteeseen G19 verrattuna selkeästi ohuempia. Koska muiden työssä valmistettujen, lesitiinilaatua 1 sisältävien, näytteiden reologisten

mittausten tulosten perusteella Aerosil® 300:n havaittiin olevan Aerosil® 200:aa heikompi sakeuttaja, on mahdollista, että näytteen G19 valmistuksessa on esiintynyt joitakin poikkeavaisuuksia.

### 9.3.7 Näytteiden stabiilisuus

Kolmen kuukauden säilytysajanjaksoon liittyvät reologiset stabiilisuusmittaukset suoritettiin geelinäytteille G1, G36, G45, G46, G47 ja G50. Stabiilisuusmittausten tulosten perusteella geelinäytteiden G1, G45, G46, G47 ja G50 varastomoduulien, kompleksisten leikkausviskositeettien ja varsinaisten viskositeettien arvojen havaittiin laskeneen ja häviötangenttien arvojen vastaavasti nousseen säilytysajanjakson aikana merkittävästi, mikä indikoi ongelmia näytteiden stabiilisuudessa (Kuva 20; Taulukko 9) (TAInstruments AAN016; Korhonen 2003; TAInstruments 2005; Hill 2010). Näytteiden G46 ja G50 kohdalla muutokset reologisissa parametreissa olivat muita tutkittuja näytteitä suurempia. Syytä havainnolle ei kuitenkaan vielä tiedetä.



Kuva 20. 5 % piidioksidia ja 0,5 % lesitiinilaatua 1 (G1) sekä 5 % piidioksidia ja 2,75 % lesitiinilaatua 7 (G46) sisältävien näytteiden varastomoduulien arvot 3 kuukauden kuluttua näytteiden valmistuksesta dynaamisella jännityskontrolloidulla rotaatioreometrillä 0,1 % venymällä mitattuna.



Muista tutkituista näytteistä poiketen, pelkkää piidioksidia sisältävän näytteen G36 havaittiin reologisten mittausten tulosten perusteella paksuuntuvan ja stabiloituvan työhön kuuluvan kolmen kuukauden säilytysajanjakson aikana selkeästi (Taulukko 9) (TAInstruments AAN016; Korhonen 2003; TAInstruments 2005; Hill 2010). Syytä näytteiden erilaiselle käyttäytymiselle säilytysajanjakson aikana ei vielä tiedetä. On kuitenkin mahdollista, että pelkkää piidioksidia sisältävä näyte G36 ei 1 viikon mittauspisteessä suoritettujen reologisten mittausten aikaan ollut vielä saavuttanut maksimiviskositeettiaan, mistä johtuen näytteen reologiset parametrit nousivat säilytysajanjakson aikana selkeästi.

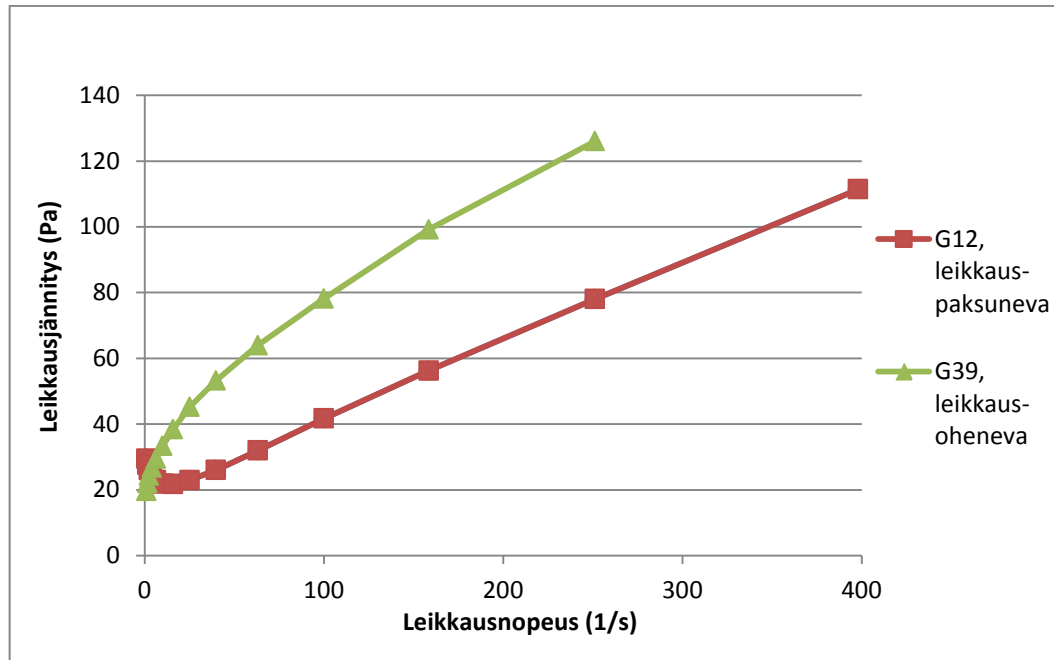
Oskilloivien jännitysten ja varastomoduulien arvojen välisenä funktiona määritettyjen myötörajojen avulla on mahdollista arvioida geelien varastostabiilisuutta (TAInstruments AAN016; TAInstruments 2005). Säilytyksen aikana pienentyneiden myötörajojen arvojen arvioidaan indikoivan muutoksia lopputuotteiden stabiilisuudessa. Reologisten mittausten tulosten perusteella *high shear*-sekoitetuille näytteille G33 ja G34 sekä *low shear*-sekoitetulle näytteelle G10 ei varastomoduulien epätasaisten arvojen vuoksi ollut mahdollista määrittää myötörajaa 1 viikon kuluttua näytteiden valmistuksesta. Osalle näytteistä myötöraja on ilmoitettu merkinnällä ” ~ 0”. Tämä johtuu siitä, että näytteiden myötörajan arvon ollessa hyvin lähellä nolla-jännitystä, ei myötörajaa käytännössä ollut mahdollista määrittää näytteille luotettavasti. Tutkittujen näytteiden myötörajojen arvojen havaittiin 3 kuukauden säilytysajanjakson aikana laskeneen kaikkien muiden näytteiden paitsi näytteen G36 kohdalla merkittävästi (Taulukko 9). Myötörajojen laskun indikoidessa ongelmia näytteiden stabiilisuudessa, voidaankin pitää todennäköisenä, että valmistettujen geelinäytteiden stabiilisuus heikkeni säilytysajanjakson aikana olennaisesti (TAInstruments AAN016; TAInstruments 2005). Tämä tukee silmämääräisesti tehtyä havaintoa siitä, että useimmissa työssä valmistetuissa geelinäytteissä oli 3 kuukauden säilytysajanjakson päätyttyä havaittavissa selkeää synereesiä.

Myötörajan lisäksi näytteiden stabiilisuutta on mahdollista arvioida myös kuvissa 7–19 esiintyvien lineaaristen viskoelastisten alueiden pituuksien perusteella, pidempien lineaaristen viskoelastisten alueiden indikoidessa näytteiden parempaa stabiilisuutta

(TAInstruments 2005; Hill 2010). Tämän työn perusteella lineaaristen viskoelastisten alueiden pituus oli suurin *high shear*-sekoitetulla geelinäytteellä G35, mistä johtuen *high shear*-sekoitustavan voidaan tämän työn perusteella odotetusti arvioida parantavan näytteiden stabiilisuutta työssä pääsääntöisesti käytettyyn *low shear*-sekoitustapaan verrattuna (Aerosil Technical Information No. 1279). Pelkkää piidioksidia sisältävistä *low shear*-sekoitetuista näytteistä stabiilein, ja lähimpänä *high shear*-sekoitettujen näytteiden stabiilisuutta, oli 10 % piidioksidia sisältävä näyte G36. Pinta-aktiivisia aineita sisältävistä näytteistä krilliöljyä ja lesitiinilaatua Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA sisältävien näytteiden lineaariset viskoelastiset alueet olivat reologisten mittausten tulosten perusteella Phosal® 35 SB-lesitiinilaatua sisältävien näytteiden lineaarisia viskoelastisia alueita pidempiä. Phosal® 35 SB-lesitiinilaatua sisältävien näytteiden lineaariset viskoelastiset alueet olivat puolestaan tokoferolia sisältävien näytteiden lineaarisia viskoelastisia alueita pidempiä.

### 9.3.8 Näytteiden virtausominaisuudet

Työssä suoritettujen reologisten mittausten tulosten perusteella useimpien työssä valmistettujen organogeelinäytteiden havaittiin olevan virtausominaisuuksiltaan leikkausohenevia, pseudoplastisia nesteitä, joilla kuitenkin oli tulosten perusteella havaittavissa myös Bingham-plastisten nesteiden ominaisuuksia seosten liikkeelle lähdön vaatiessa tiettyjä leikkausjännitysten arvoja (Kuva 21) (TAInstruments 2005; Hill 2010). Toisaalta joillakin geelinäytteillä (Näytteet G1, G6, G9, G12, G18, G19, G21, G24, G27, G42, G43, G46–G51) oli reologisten mittausten tulosten perusteella havaittavissa leikkausohenevista ominaisuuksista poiketen myös leikkauspaksunevia ominaisuuksia (Kuva 21) (TAInstruments 2005; Hill 2010). Leikkauspaksunevat ominaisuudet tulivat pääsääntöisesti ilmi näytteillä, joiden valmistuksessa oli käytetty lesitiini- ja krilliöljypitoisuuksien suhteen pienimpiä pitoisuustasoja, kun taas suuremmilla pitoisuustasoilla näytteet käyttäytyivät leikkausnopeuden ja leikkausjännityksen suhteen leikkausohenevasti. Pienten pitoisuuksien lisäksi lesitiinilaadun 7 kohdalla myös suurempia pitoisuustasoja sisältävien näytteiden havaittiin reologisten mittausten tulosten perusteella käyttäytyvän leikkauspaksunevasti.

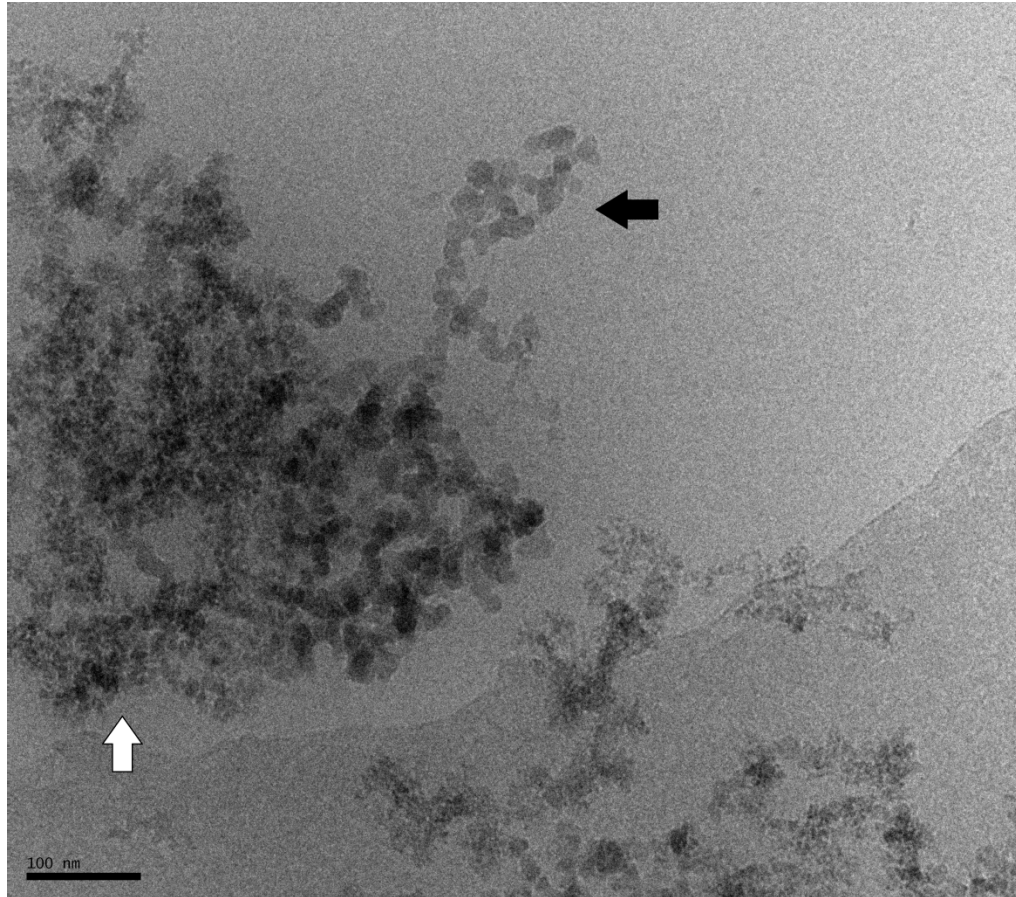


Kuva 21. Työssä valmistettujen näytteiden virtausominaisuuksia. Kuvassa on esimerkinomaisesti käytetty näytteiden G12- ja G39-tuloksia.

#### 9.4 Cryo-TEM

Tässä työssä Cryo-TEM-menetelmän avulla toivottiin olevan mahdollista tarkastella organogeelinäytteiden kolmiulotteisia verkkorakenteita sekä ymmärtää mahdollisia toimintaperiaatteita pinta-aktiivisten aineiden sakeuttavien ominaisuuksien taustalla. Cryo-TEM-määritysten tulosten perusteella piidioksidia ja krilliöljyä sisältävässä näytteessä G46 oli havaittavissa kahdenlaisia partikkelirakenteita: epämääräisen muotoisia, tiheästi asettautuneita, pienikokoisista hiukkasista koostuvia klusterirakenteita sekä selkeästi tarkkarajaisempia ja pyöreämpikulmaisia, ketjumaisiksi aggregaattirakenteiksi asettautuneita rakenneosasia (Kuva 22). Aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella pyöreämpikulmaisten, ketjuiksi asettautuneiden aggregaattirakenteiden voidaan arvioida olevan piidioksidia (Wu ym. 2012; Liang ym. 2014). Koska geelinäytteeseen G46 lisättiin piidioksidin lisäksi pinta-aktiiviseksi aineeksi krilliöljyä, on mahdollista, että kuvassa 22 nähdyt pienikokoiset, tiheästi asettautuneet klusterirakenteet koostuisivat krilliöljyn komponenteista. Koska pelkkää piidioksidia sisältävää vertailunäytettä ei kuitenkaan saatu Cryo-TEM-menetelmällä kuvattua toivotusti, ei pitkälle meneviä johtopäätöksiä geelinäytteen sisältämistä rakenneosasista ole mahdollista tehdä luotettavasti. Geelipohjana käytetyn öljyn

voidaan havaita erottuvan elektronimikroskooppikuvassa amorfisena kohinana (Kuva 22).



Kuva 22. Läpäisyelektronimikroskooppikuva geelinäytteestä G46. Oletetut silikarakenteet on merkitty kuvaan mustalla nuolella. Valkoinen nuoli kuvaa geelinäytteessä havaittuja, epämääräisen muotoisia, tiheästi asettautuneita klusterirakenteita.

Näytteessä G46 ei tässä työssä saatujen tulosten perusteella havaittu geeleille tyypillistä kolmiulotteista verkkorakennetta odotetusti (Kuva 22) (Vintilou ja Leroux 2008). Sitä, johtuuko geelirakenteiden poikkeavuus näytteiden käsittelyyn tai mittausmenetelmään liittyvästä mahdollisesta rajoittuneisuudesta vaiko rakenteiden todellisesta poikkeavuudesta, ei kuitenkaan vielä tässä vaiheessa tiedetä. Koska Cryo-TEM-menetelmää ei Cryo-EM yksikössä ole aikaisemmin käytetty öljypohjaisten geelien tutkimuksessa, ei menetelmän käytännön toteutusta välttämättä suoritettu näytteille parhaalla mahdollisella tavalla. Cryo-TEM-menetelmällä saadut kuvat olivat paksujen öljykerrosten vuoksi tavallisiin vesipohjaisiin näytteisiin verrattuna huomattavasti

sameampia, minkä vuoksi suuria klusterirakenteita ei elektronimikroskooppikuvien perusteella ollut mahdollista tarkastella näytteissä kovinkaan yksityiskohtaisesti.

Muista tässä työssä tutkituista organogeelinäytteistä ei näytteen G46 tavoin ollut mahdollista ottaa elektronimikroskooppikuvia Cryo-TEM-menetelmällä toivotusti. Tämä johtui näytehilojen päälle muodostuneista paksuista organogeelikalvoista, joiden läpi kuvantamisessa käytetty elektronisuihku ei päässyt kulkeutumaan odotetusti. Tässä työssä tehtyjen havaintojen perusteella on todennäköistä, että läpäisyelektronimikroskooppikuvien saanti paksuista ja jähmeistä organogeelinäytteistä on hankalaa ja onnistuessaankin huonosti toistettavaa. Tarkempaa analyysiä tässä työssä valmistettujen näytteiden nanometriluokan rakenteista on tämän vuoksi Cryo-TEM-menetelmällä saatujen kuvien avulla vaikeaa tehdä toivotulla tavalla.

## 9.5 Mahdolliset virhelähteet

Piidioksidin geelinmuodostusta tehostavana komponenttina työn esikokeissa käytettiin luvun 8.1.3 mukaisesti krilliöljykapseleita, joiden käyttöön liittyi kuitenkin muutamia käytännön ongelmia. Kapseleiden sisältämää krilliöljyä käsiteltiin työssä neulan ja ruiskun avulla. Koska esikokeissa käytetyt kapselit olivat kuitenkin laadultaan jo hieman vanhempaa erää, olivat kapseleiden kuori ja sisältö ainakin osassa käytetyistä kapseleista ehtineet osittain kovettumaan, mikä hankaloitti kapseleiden sisällön käsittelyä. Ruiskun ja neulan avulla ei kovettuneen kuoren ja sisällön vuoksi ollut mahdollista vetää kapseleiden sisältöä ulos kapseleista kokonaisuudessaan, eikä varsinaisten geelinäytteiden valmistuksessa näin ollen ollut mahdollista käyttää kapseleiden sisältöä välttämättä tasapuolisesti, mikäli kapseleiden kovettunut sisältö poikkesi joltain osin krilliöljykapseleiden tavanomaisesta koostumuksesta. Tämän mahdollisen virhelähteen minimoimiseksi varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa päätettiin käyttää nestemäistä, pulloissa toimitettavaa krilliöljyä. Koska pulloitetun krilliöljyn havaittiin varsinaisten koesarjan organogeelinäytteiden valmistuksessa sakeuttavan kalaöljyä ja 5 % piidioksidia sisältäviä seoksia kuitenkin esikokeista poikkeavalla tavalla, on mahdollista, että pulloissa ja kapseleissa toimitettavien krilliöljylaatujen välillä on esiintynyt joitakin eroavaisuuksia. Tästä

johtuen työssä päätettiin valmistaa muutamia ylimääräisiä geelinäytteitä myös kapselien sisältämällä krilliöljyalaadulla, käyttämällä varsinaisten organogeelinäytteiden valmistuksessa kuitenkin esikokeisiin verrattuna tuoreempia kapselieriä.

Vaikka reologisten mittausten näytteiden käsittelyyn liittyvää epävarmuutta arvioitiinkin työssä esikokeiden avulla suorittamalla kahdesta erillisestä organogeelinäytteestä yhteensä kolme peräkkäistä määritystä, on mahdollista, että näytteiden käsittelyssä tai mittausten suorittamisessa on organogeelinäytteiden välillä esiintynyt joitakin eroavaisuuksia. Lisäksi, koska varsinaiset reologiset mittaukset organogeelinäytteille on valmistuspäivien mukaisesti suoritettu eri päivinä, on mahdollista, että näytteiden kuljetusten tai mittausten aikaisissa olosuhteissa on esiintynyt joitakin vaihteluita. Reologisissa mittauksissa virhelähdettä tuloksiin on voinut aiheuttaa myös mittausten käytännön suoritustapa, jossa samaa näytettä käytettiin kaikkien kolmen mittaustavan suorittamisessa ilman, että uusi näyte vaihdettiin vanhan näytteen tilalla mittaustapaa vaihdettaessa. Koska mittaukset suoritettiin kaikille geelinäytteille samassa järjestyksessä, ovat mittaustulokset mahdollisesta suuruusluokkaan liittyvästä virheestä huolimatta kuitenkin toistensa kanssa todennäköisesti vertailukelpoisia. Virhelähdettä tuloksiin on edellä mainittujen tekijöiden lisäksi voinut aiheuttaa myös itse laitteen toimintaan liittyvät mahdolliset poikkeavuudet.

Organogeelinäytteiden valmistukseen liittyvää toistettavuutta arvioitiin työssä valmistamalla organogeelinäytteitä samoilla parametreilla yhteensä kolmena peräkkäisenä toistona. Vaikka reologisten mittausten tulosten perusteella valmistukseen liittyvä toistettavuus säilyikin erilaisten organogeelinäytteiden välillä riittävällä tasolla, ovat valmistuksen aikaiset olosuhteiden vaihtelut sekä valmistajan inhimilliset virheet saattaneet aiheuttaa työhön virhelähdettä. Mahdollisia valmistukseen liittyviä virhelähteitä ovat ainakin raaka-aineiden ja osanäytteiden ottoon liittyvien punnitusten mahdollinen epätarkkuus sekä piidioksidin esidispergoinnissa käytetty ennalta määrittelemätön sekoitusaika. Valmistukseen liittyviä virhelähteitä on työssä pyritty minimoimaan käyttämällä kaikissa punnituksissa samaa vaakaa ja samoja teräksisiä tai

lasisia punnitus- ja valmistusastioita. Varsinaisina valmistusmenetelminä työssä on puolestaan virhelähteiden minimoimiseksi käytetty tarkasti määriteltyjä, esikokeissa testattuja valmistusmenetelmiä.

## 9.6 Yhteenveto

Varmaa syytä krilliöljyn ja lesitiinilaatujen kyvyille tehostaa piidioksidia ja kalaöljyä sisältävien seosten sakeutumista ei vielä tiedetä. Kuten luvuissa 5.2.2 ja 6.2.2 on esitetty, valmistetaan lesitiinillä sakeutettuja organogeelejä tavallisesti lisäämällä orgaanisia liuottimia ja lesitiiniä sisältäviin seoksiin pieniä määriä polaarisia liuottimia (Scartazzini ja Luisi 1988; Willmann ym. 1992). Lesitiiniliuoksia on luvun 5.2.2 mukaisesti polaaristen liuottimien lisäksi kuitenkin mahdollista sakeuttaa myös ainakin sorbitaanitristearaatin, sitosterolin ja  $\alpha$ -tokoferolin avulla (Pernetti ym. 2007; Han ym. 2013; Nikiforidis ja Scholten 2014). Tässä työssä lesitiiniä sisältävien kalaöljypohjaisten organogeelien valmistuksessa ei kuitenkaan ole käytetty polaarisia liuottimia, sorbitaanitristearaattia, sitosterolia tai  $\alpha$ -tokoferolia, vaan kalaöljyjen ja lesitiinien lisäksi organogeeleihin on lisätty mukaan kolloidaalista piidioksidia. Kiinteiden silikapartikkeleiden tiedetään sisältävän pinnallaan hydroksyyli ryhmiä, jotka kykenevät sekä vetysidosten luovutukseen että vetysidosten vastaanottamiseen (Aerosil Technical Information No. 1281). Tässä työssä sekä Langfordin (2011) patentissa havaittujen sakeutumisten perusteella yhtenä mahdollisena hypoteesina lesitiiniä sisältävien organogeelien geeliytymiselle voidaankin pitää silikapartikkelien toimintaa polaaristen liuottimien tilalla vetysidosten muodostajina. Toiseksi mahdolliseksi hypoteesiksi kalaöljyjen sakeutumiselle voidaan puolestaan ehdottaa lesitiinin kykyä modifioida piidioksidin kidemuotoja, saaden piidioksidissa aikaan organogeelien kolmiulotteisia verkostoja tehokkaammin muodostavien kidemuotojen muodostumista. Kuten luvussa 5.2.2 on esitetty, on lesitiinien havaittu kykenevän modifioimaan ainakin sorbitaanitristearaattien kidemuotojen morfologiaa vaikuttamatta kuitenkaan niiden varsinaisiin kiderakenteisiin (Pernetti ym. 2007).

Vaikka kalaöljyä onkin mahdollista sakeuttaa piidioksidilla myös ilman krilliöljyä tai lesitiiniä joko korkeita leikkausnopeuksia tai korkeita piidioksidipitoisuuksia

käytettäessä, liittyy näin toteutettuihin valmistusprosesseihin kuitenkin muutamia käytännön ongelmia (Aerosil Technical Information No. 1279). Ensinnäkin *high shear*-sekoitettujen organogeelinäytteiden havaitaan usein sisältävän *low shear*-sekoitettuihin näytteisiin verrattuna huomattavasti enemmän ilmakuplia, minkä voidaan arvioida heikentävän geelien stabiilisuutta pitkäaikaisen säilytyksen aikana. Lisäksi ongelmia aiheuttaa korkeiden leikkausnopeuksien yhteydessä havaittu geelien hidas muodostuminen. Koska geelit eivät työssä käytetyillä *high shear*-sekoituselementeillä muodostuneet heti valmistuksen yhteydessä toivotusti, ei kiinteitä lääkeaineita voitu lisätä valmisteisiin sekoitusprosessin yhteydessä odotetusti, vaan lääkeaineiden lisäys näytteisiin jouduttiin toteuttamaan erillisessä valmistusvaiheessa. Tuotannon järjestämisen kannalta viikon mittainen tai pidempikin varastointi ennen prosessin loppuunsaattamista ei käytännössä ole toimiva ratkaisu. Koska pieniä krilliöljypitoisuuksia käytettäessä ohuiden geelien havaittiin muodostuvan heti valmistuksen yhteydessä toivotusti, ei vastaavaa useamman prosessivaiheen valmistusongelmaa muodostunut. Pinta-aktiivisten aineiden lisääminen kalaöljyn ja 5 % piidioksidin seoksiin vähensi siis työssä tehtyjen havaintojen perusteella paitsi sekoituksen tarvetta, myös helpotti ja lyhensi varsinaista prosessin kulkua.

## 10. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä tehtyjen havaintojen perusteella krilliöljyn ja lesitiinilaatujen Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA voidaan tietyillä pitoisuustasoilla arvioida tehostavan piidioksidilla sakeutettujen kalaöljypohjaisten seosten sakeutumista. Erityisesti krilliöljyn havaittiin työn perusteella kykenevän sakeuttamaan piidioksidilla sakeutettuja kalaöljyseoksia myös pieniä pitoisuuksia ja matalia leikkausnopeuksia käytettäessä, kun taas pelkkää piidioksidia ja kalaöljyä sisältävien seosten sakeuttamiseen tarvittiin työn perusteella joko korkeita piidioksidipitoisuuksia tai korkeita leikkausnopeuksia. Aerosilin® valmistaja Evonik suosittelee piidioksidipohjaisten organogeelien sakeuttamiseen korkean leikkausnopeuden systeemejä kuten Ultra Turraxia tai erilaisia sahalaitaisin terin varustettuja *high shear*-sekoituselementtejä, mikä kuvaa hyvin alalla tällä hetkellä vallitsevaa yleistä käsitystä.



Tämä työ kuitenkin osoittaa, että kalaöljyä ja piidioksidia sisältäviä seoksia on korkeiden leikkausnopeuksien lisäksi mahdollista sakeuttaa geelimäisiksi seoksiksi myös matalilla leikkausnopeuksilla, mikäli seoksiin lisätään piidioksidin geeliytymistä tehostaviksi komponenteiksi krilliöljyä tai muita tässä työssä käytettyjä lesitiinilaatujia. Koska pullotetusta krilliöljystä poiketen krilliöljykapseleiden sisältämän krilliöljyn havaittiin esikokeissa toimivan organogeelien sakeuttamisessa myös suurilla, 3 % ja 5 %, pitoisuuksilla, on mahdollista, että krilliöljyn laadulla on vaikutusta piidioksidiorganogeelien sakeutumisessa. Syytä pullotettujen krilliöljyjen ja kapseleiden sisältämien krilliöljyjen välillä havaittuihin eroihin ei vielä tunneta. Valmistajalta saatujen analyysitodistusten perusteella molempien krilliöljylaatujen voidaan kuitenkin havaita olevan keskeisimpien komponenttiensa suhteen toistensa kanssa yhdenmukaisia.

Vaikka krilliöljyjen ja lesitiinilaatujen Phosal® 35 SB, Phosal® 53 MCT ja Phosal® 75 SA havaittiinkin työssä tietyillä pitoisuustasoilla tehostavan piidioksidipohjaisten kalaöljyseosten sakeutumista, eivät työlle asetetut etukäteisvaatimukset organogeelien koostumuksen pastamaisuudesta ja jähmeydestä tai 2 vuoden pituisesta stabiilisuusajasta kuitenkaan toteutuneet toivotusti. Esikokeissa tehtyjen havaintojen perusteella on kuitenkin mahdollista, että käyttämällä organogeelien valmistuksessa joko erilaisia krilliöljy- ja kalaöljylaatujen yhdistelmiä tai voimakkaampia sekoitusmenetelmiä, myös jähmeiden ja pastamaisten, stabiilien organogeelien muodostaminen voisi ainakin piidioksidin ja krilliöljyn avulla olla mahdollista.

Vaikka piidioksidilla ja pinta-aktiivisilla aineilla sakeutettujen kalaöljypohjaisten organogeelien käyttäytymisestä saatiinkin tämän työn avulla selville paljon uutta ja arvokasta tietoa, herätti työ kuitenkin saatuihin tuloksiin nähden vähintään yhtä suuren määrän uusia kysymyksiä ja jatkoselvitystarpeita. Ehkä keskeisimpänä kaikista jatkoselvitystarpeista olisi selvittää, mitkä ovat krilliöljyn ja lesitiinin varsinaiset toimintamekanismit piidioksidipohjaisten organogeelien sakeuttamisessa. Tätä kautta jatkoselvitykset myös siitä, tuottaako krilliöljyjen tai lesitiinien lisäys jotain oleellista lisäarvoa pelkällä piidioksidilla sakeutettuihin seoksiin verrattuna, ovat jatkokehityksen kannalta keskeisiä. Yksi mielenkiintoinen kysymys on, että mikäli pinta-aktiivisia aineita vastaava sakeuttava vaikutus saadaan aikaan myös pelkällä 10 %

piidioksidilisäyksellä, onko useamman prosessivaiheen ja komponentin vaativa organogeelien valmistus valmistaiden mahdollista epämiellyttävää suutuntumaa tärkeämpi tekijä. Koska tässä työssä voimakkaat sekoitusmenetelmät näyttivät esikokeiden perusteella parantavan geelinäytteiden stabiilisuutta, ovat lisäselvitykset sekoitusvoimakkuuden ja stabiilisuuden välisistä vuorovaikutuksista relevantteja. Tähän liittyen lienee keskeistä myös selvittää, onko koko valmistusprosessi tarpeen suorittaa korkeilla leikkausnopeuksilla, vai riittäisikö korkeilla leikkausnopeuksilla suoritettu piidioksidin dispergointi ja matalilla leikkausnopeuksilla suoritettu lesitiinin lisäys saamaan aikaan riittävän stabiilisuustasteen. Lyhytaikaisten stabiilisuustutkimusten lisäksi myös varsinaiset pitkäaikaiset stabiilisuustutkimukset ovat jatkokehityksen kannalta tarpeellisia. Krilliöljyn ja lesitiinin mahdollisen toimintaperiaatteen selvittämisen jälkeen herää esiin mielenkiintoinen kysymys myös siitä, olisiko vastaava sateuttava vaikutus mahdollista saada aikaiseksi myös joidenkin muiden pinta-aktiivisten aineiden kuin krilliöljyjen ja lesitiinien avulla.

## 11. KIRJALLISUUSLUETTELO

Abdallah DJ, Weiss RG: Organogels and Low Molecular Mass Organic Gelators. *Advanced Materials* 12: 1237–1247, 2000

Adebowale A, Du J, Liang Z, Leslie, JL ja Eddington ND: The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 23: 217–225, 2002

Aerosil Technical Information No. 1279-1/Mar06. Successful Use of AEROSIL® Fumed Silica in Liquid Systems. Degussa Corporation.

Aerosil Technical Information No. 1281. AEROSIL® and AEROPERL® Colloidal Silicon Dioxide for Pharmaceuticals. Evonik Degussa Corporation.

Andreasen LV, Wood GK, Christensen D: Methods for producing liposomes 2012. WO 2013004234 A2 20120703

Angelico R, Ceglie A, Colafemmina G, Lopez F, Murgia S, Olsson U, Palazzo G: Biocompatible lecithin organogels: Structure and phase equilibria. *Langmuir* 21: 140–148, 2005

Appel LJ, Miller III ER, Seidler AJ, Whelton PK: Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Archives of Internal Medicine* 153: 1429–1438, 1993

Arokoski J, Vuolteenaho K, Lammi MJ, Moilanen E: Nivelrikon lääkehoito. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 124: 1899–1907, 2008a

Arokoski J, Vuolteenaho K, Lammi M, Moilanen E. Glukosamiini nivelrikon hoidossa. *Suomen Lääkärilehti* 63: 55–58, 2008b

Aulton ME: Rheology. Kirjassa Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines, s. 42–58, 3. painos. Toim. Aulton ME, Churchill Livingstone Elsevier, 2007

Baggot JD, Brown SA: Basis for Selection of the Dosage Form. Kirjassa Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms, s. 7–143, 2. painos. Toim. Hardee GE, Baggot JD, Marcel Dekker, Inc., New York, 1998

Balasubramanian R, Sughir AA, Damodar G: Oleogel: A promising base for transdermal formulations. *Asian Journal of Pharmaceutics* 6: 1–9, 2012

Bardelang D, Camerel F, Margeson JC, Leek DM, Schmutz M, Zaman MdB, Yu K, Soldatov DV, Ziessel R, Ratcliffe CI, Ripmeester JA: Unusual sculpting of dipeptide particles by ultrasound induces gelation. *Journal of the American Chemical Society* 130: 3313–3315, 2008

Barry BW: Rheology of Pharmaceutical and Cosmetic Semisolids. *Advances in Pharmaceutical Sciences* 4: 1–72, 1974

Basrur VR, Guo J, Wang C, Raghavan SR: Synergistic gelation of silica nanoparticles and a sorbitol-based molecular gelator to yield highly-conductive free-standing gel electrolytes. *ACS Applied Materials and Interfaces* 5: 262–267, 2013

Bastiat G, Plourde F, Motulsky A, Furtos A, Dumont Y, Quirion R, Fuhrmann G, Leroux J-C: Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31: 6031–6038, 2010

Benitez R, Contreras S, Goldfarb J: Dispersions of methylated silica in mixed solvents. *Journal of Colloid And Interface Science* 36: 146–150, 1971

Blake AI, Co ED, Marangoni AG: Structure and Physical Properties of Plant Wax Crystal Networks and Their Relationship to Oil Binding Capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91: 885–903, 2014

Chapel J-P: Electrolyte Species Dependent Hydration Forces between Silica Surfaces. *Langmuir* 10: 4237–4243, 1994

Cherry JP, Gray MS, Jones LA: A review of lecithin chemistry and glandless cottonseed as a potential commercial source. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58: 903–913, 1981

Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham III CO, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher Jr. HR, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ: Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *New England Journal of Medicine* 354: 795–808, 2006

Co ED, Marangoni AG: Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 749–780, 2012

Craythorne SJ, Pollock CL, Blake AJ, Nieuwenhuyzen, Marr AC, Marr PC: A low molecular weight hydro and organogelator derived from an isohexide and sol-gel transcription of the alcogel. *New Journal of Chemistry* 33: 479–483, 2009

Curtis CL, Hughes CE, Flannery CR, Little CB, Harwood JL, Caterson B: n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *Journal of Biological Chemistry* 14: 721–724, 2000

Daman Huri MF, Ng S-F, Zulfakar MH: Fish oil-based oleogels: Physicochemicals characterization and in vitro release of betamethasone dipropionate. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5: 458–467, 2013

Danino D, Talmon Y: Direct-Imaging and Freeze-Fracture Cryo-Transmission Electron Microscopy of Molecular Gels. *Kirjassa Molecular Gels*, s. 253–274, 1. painos, Toim. Weiss RG, Terech P, Springer Netherlands, 2006

Danino D, Talmon Y, Zana R: Cryo-TEM of thread-like micelles: On-the-grid microstructural transformations induced during specimen preparation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 169: 67–73, 2000

Dey T, Kim DA, Marangoni AG: Ethylcellulose oleogels. *Kirjassa Edible oleogels: structure and health implications*, s. 295–311, 1. painos, Toim. Marangoni AG, Garti N, AOCS Press, Urbana, 2011

Diáz DD, Marrero Tellado JJ, Velázquez DG, Ravelo AG: Polymer thermoreversible gels from organogelators enabled by “click” chemistry. *Tetrahedron Letters* 49: 1340–1343, 2008

Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 2: 117–119, 1978

Drugs: OsteO-3 Joint & Hip Gel For Cats 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: <http://www.drugs.com/vet/osteo-3-joint-hip-gel-for-cats.html>

EFSA: Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity, 2010. Haettu 24.5.2014 Internetistä: <http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/1874.pdf>

Eger S, Ehrlich M, Neeman I: Lamellar Liquid Crystals in Viscous Oil Product 2003. WO 03/005831 20030123

European Pharmacopoeia 8.1. Haettu 15.4.2014 Internetistä: <http://online6.edqm.eu/ep801/>

Excel Cybervet: Senior Vitamin Paste 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: [http://www.excelcybervet.com/catalog/prod\\_detail.php?petID=1&secID=1&catID=23&id=9](http://www.excelcybervet.com/catalog/prod_detail.php?petID=1&secID=1&catID=23&id=9)

Fomuso LB, Corredig M, Akoh CC: Effect of Emulsifier on Oxidation Properties of Fish Oil-Based Structured Lipid Emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2957–2961, 2002

George M, Weiss RG: Chemically Reversible Organogels via “Latent” Gelators. Aliphatic Amines with Carbon Dioxide and Their Ammonium Carbamates. Langmuir 18: 7124–7135, 2002

Geria NM: Oil compositions of increased viscosity and method of preparing the same 1988. EP 0 296 118 A2 19881221

Ghouchi Eskander N, Simovic S, Prestidge CA: Synergistic effect of silica nanoparticles and charged surfactants in the formation and stability of submicron oil-in-water emulsions. Phys. Chem. Chem. Phys 9: 6526–6434, 2007

Ghouchi Eskander N, Simovic S, Prestidge CA: Interactions of hydrophilic silica nanoparticles and classical surfactants at non-polar oil-water interface. Journal of Colloid and Interface Science 358: 217–225, 2011

Goldberg RJ, Katz J: A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain. Pain 129: 210–223, 2007

Goupale DC, Raj Kapoor B: Evaluation of Physical Stability of Oleogels Containing Diclofenac Diethylamine. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2: 92–99, 2011

Gravelle AJ, Barbut S, Marangoni AG: Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation. Food Research International 48: 578–583, 2012

Griinari M: Ravintolisä osana koiran nivelriikon monimuotoista hoitoa 2012. Haettu 17.4.2014 Internetistä: <http://www.nutrolin.fi/asiantuntija-artikkelit/nivelriikkokoiran-hoito-nutrolin-nivel/>

Gruenwald J, Petzold E, Busch R, Petzold HP, Graubaum HJ: Effect of glucosamine sulfate with or without omega-3 fatty acids in patients with osteoarthritis. *Advances in Therapy* 26: 858–871, 2009

Han L-J, Li L, Zhao L, Li B, Liu G-Q, Liu X-Q, Wang X-D: Rheological properties of organogels developed by sitosterol and lecithin. *Food Research International* 53: 42–48, 2013

Hapgood KP: Colloidal Silicon Dioxide. *Kirjassa Handbook of Pharmaceutical excipients*, s. 185–188, 6. painos. Toim. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington 2009a

Hapgood KP: Hydrophobic Colloidal Silica. *Kirjassa Handbook of Pharmaceutical excipients*, s. 309–310, 6. painos. Toim. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington 2009b

Heard CM, Gallagher SJ, Harwood JL, Maguire PB: The in vitro delivery of NSAIDs across skin was in proportion to the delivery of essential fatty acids in the vehicle - Evidence that solutes permeate skin associated with their solvation cages? *International Journal of Pharmaceutics* 261: 165–169, 2003

Hielm-Björkman A, Roine J, Elo K, Lappalainen A, Junnila J, Laitinen-Vapaavuori O: An un-commissioned randomized, placebo-controlled double-blind study to test the effect of deep sea fish oil as a pain reliever for dogs suffering from canine OA. *BMC Veterinary Research* 8: 157–170, 2012

Hill A: Rheology Basics: Introducing The Malvern Kinexus A Practical Measurement Perspective 2010. Power Point-diat. Haettu 28.10.2014 Internetistä: <http://www.atascientific.com.au/eventsandtraining/eventsandtraining/wp-content/uploads/2013/01/Rheology-Basics-Introduction-to-Rheology-and-Kinexus.pdf>

Hrubesh LW: Aerogel applications. *Journal of Non-Crystalline Solids* 225: 335–342, 1998

Huang X, Weiss GR: Silica Structures Templated on Fibers of Tetraalkylphosphonium Salt Gelators in Organogels. *Langmuir* 22: 8542–8552, 2006

IKA: S25N–18G Dispersing Element Technical data 2014. Haettu 19.5.2014 Internetistä: [http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product\\_detail?iProduct=0593400](http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product_detail?iProduct=0593400)

Iwanaga K, Sumizawa T, Miyazaki M, Kakemi M: Characterization of organogel as a novel oral controlled release formulation for lipophilic compounds. *International Journal of Pharmaceutics* 388: 123–128, 2010

Iwanaga K, Kawai M, Miyazaki M, Kakemi M: Application of organogels as oral controlled release formulations of hydrophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 436: 869–872, 2012

- Jadhav NK, Patil KA, Patil JK, Patil PA, Pawar SP: A review on organogels: Lipid based carrier systems. *Pharma Science Monitor* 3: 3132–3143, 2012
- Jerosch J: Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *International Journal of Rheumatology* 2011: 1–17, 2011
- Johnston SA: Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology and pathobiology. *The Veterinary clinics of North America: Small animal practice* 27: 699–723, 1997
- Jung JH, Amaike M, Shinkai S: Sol-gel transcription of novel sugar-based superstructures composed of sugar-integrated gelators into silica: Creation of lotus-shaped silica structure. *Chemical Communications* 23: 2343–2344, 2000
- Katsuda MS, McClements DJ, Miglioranza LHS, Decker EA: Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with  $\beta$ -lactoglobulin and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5926–5931, 2008
- Keck CM, 2006: Cyclosporine nanosuspensions -optimized size characterization & oral formulations. Doctoral thesis. Department of Biology, Chemistry and Pharmacy. Freie Universität Berlin, Saksa
- Khan SA, Zoeller NJ: Dynamic Rheological Behavior of Flocculated Fumed Silica Suspensions. *Journal of Rheology* 37: 1225–1235, 1993
- Khromova YuL, Shumilina EV, Shchipunov YuA: Lecithin organogels containing poly(ethylene glycol) monolaurate. *Colloid Journal* 63: 242–247, 2001
- Korhonen M, 2003: Rheological properties of pharmaceutical creams containing sorbitan fatty acid ester surfactants. Vältöskirja. Farmasian teknologian osasto. Farmasian laitos. Helsingin Yliopisto, Helsinki
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ: Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106: 2747–2757, 2002
- Kristensen SD, Bach Iversen AM, Schmidt EB: n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary thrombosis. *Lipids* 36: S79–S82, 2001
- Kumar R, Katare OP: Lecithin Organogel as a Potential Phospholipid-Structured System for Topical Drug Delivery: A Review. *AAPS PharmSciTech* 6: E298–310, 2005
- Langford CJ: Viscous Liquid Dietary Supplement 2011. US 2012/0076914 A1 20110926
- Laukkanen OV: Dynaamisen leikkausreometrin käyttö bitumitutkimuksissa 2013. Power Point-diat. Haettu 20.5.2014 Internetistä: [pank.fi/file/770/laukkanen\\_menetelm-p-iv-.pdf](http://pank.fi/file/770/laukkanen_menetelm-p-iv-.pdf)

Liang C, Wang L, Liu W, Song Z: Non-spherical colloidal silica particles – Preparation, application and model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 457: 67–72, 2014

Lortz BM: WG: Re: AEROSIL® 200/ Clanet Ltd, Finland [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Mikko Griinari. Lähetetty 11.11.2011

Marr PC, McBride K, Evans RC: Sugar-derived organogels as templates for structured, photoluminescent conjugated polymer-inorganic hybrid materials. *Chem Commun* 49: 6155–6157, 2013

Martindale: The complete drug reference. 33. painos. Toim. Sweetman SC. Pharmaceutical Press, Great Britain, 2002

Martino GT, Morawsky NA: Compositions containing copolymers as a thickening agent 1997. US5736125 A 19970110

Materiaalien mekaaniset ominaisuudet. BK80A0401 Lujuusopin perusteet- kurssin luentomateriaali, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, 2011

Monfort J, Pelletier J-P, Garcia-Giralt N, Martel-Pelletier J: Biochemical basis of the effect of chondroitin sulphate on osteoarthritis articular tissues. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67: 735–740, 2008

Moreau M, Troncy E, Del Castillo JRE, Bédard C, Gauvin D ja Lussier B: Effects of feeding a high omega-3 fatty acids diet in dogs with naturally occurring osteoarthritis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 830–837, 2013

Morrison FA: Understanding Rheology. 1. painos. Oxford University Press, Inc. New York, 2001

Murdan S: Organogels in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2: 489–505, 2005

Murdan S, Andrysek T, Son D: Novel gels and their dispersions- oral drug delivery systems for ciclosporin. *International Journal of Pharmaceutics* 300: 113–124, 2005

Nair SSD, Leitch JW, Falconer J, Garg ML: Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n<sub>3</sub>) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *Journal of Nutrition* 127: 383–393, 1997

Naito M, Kawabe T, Nakamura M, Wakayama K, Chung W, Yasui K, Fujiki M: Chemical Degelation of Polysilane Organogell be Selective Scission of Silicon Main Chain by Fluoride Anion. *Chemistry Letters* 38: 414–415, 2009

Nikiforidis CV, Scholten E: Self-assemblies of lecithin and  $\alpha$ -tocopherol as gelators of lipid material. *RSC Advances* 4: 2466–2473, 2014



Nippe S, General S: Investigation of injectable drospirenone organogels with regard to their rheology and comparison to non-stabilized oil-based drospirenone suspensions. Drug Development and Industrial Pharmacy Epub, 2014

Nutri-Vet: Multi-Vite Gel 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: <http://www.nutri-vet.com/multi-vite-gel/>

Osborn HT, Akoh CC: Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. Food Chemistry 84: 451–456, 2004

Parsaee S, Sarbolouki MN, Parnianpour M: In-vitro release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. International Journal of Pharmaceutics 241: 185–190, 2002

Pasquali RC, Sacco N, Bregni C: Stability of lipogels with low molecular mass gelators and emollient oils. Journal of Dispersion Science and Technology 31: 482–487, 2010

Pedersen KS, Rønningsen HP: Effect of precipitated wax on viscosity -a model for predicting non-Newtonian viscosity of crude oils. Energy and Fuels 14: 43–51, 2000

Penzés T, 2005: Optimization and evaluation of topical used pharmaceutical organogels. PhD Thesis, Department of Pharmaceutical Technology, University of Szeged, Szeged

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H: Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50: 27–46, 2000

Pernetti M, van Malssen K, Kalnin D, Flöter E: Structuring edible oil with lecithin and sorbitan tri-stearate. Food Hydrocolloids 21: 855–861, 2007

Pet AG: Joint Solution Gel 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: <http://www.petag.com/product/dog-nutrition-supplements/joint-solution-gel/>

Polymeerimateriaalien perusteet osa 2. POLYKO-projekti. Haettu 15.5.2014 Internetistä: [https://www.tut.fi/ms/muo/polyko/materiaalit/TTY/Perus/Polymeerimateriaalien\\_perusteet\\_osa2.pdf](https://www.tut.fi/ms/muo/polyko/materiaalit/TTY/Perus/Polymeerimateriaalien_perusteet_osa2.pdf)

Pudas M, 1999: Tilastollisten menetelmien hyödyntäminen polttoainetuhkan aiheuttaman agglomeraation tutkimuksessa. Epäorgaaninen kemia. Kemian laitos. Luonnontieteellinen tiedekunta. Oulun Yliopisto.

Quinn ME: Alpha Tocopherol. Kirjassa Handbook of Pharmaceutical excipients, s. 31–33, 6. painos. Toim. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington 2009

Raghavan SR, Cipriano BH: Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheology and Calorimetry. *Kirjassa Molecular Gels*, s. 241–252, 1. painos, Toim. Weiss RG, Terech P, Springer Netherlands, 2006

Raghavan SR, Walls HJ, Khan SA: Rheology of Silica Dispersions in Organic Liquids: New Evidence for Solvation Forces Dictated by Hydrogen Bonding. *Langmuir* 16: 7920–7930, 2000

Rehman K, Tan CM, Zulfakar MH: Development and In-vitro Characterization of Fish Oil Oleogels Containing Benzoyl Peroxide and Salicylic Acid as Keratolytic Agents. *Drug research* 64: 159–165, 2014

Reichenbach S, Sterchi R, Scherer M, Trelle S, Bürgi E, Bürgi U, Dieppe PA, Jüni P: Meta-analysis: chondroitin for osteoarthritis of the knee or hip. *Annals of Internal Medicine* 146: 580–590, 2007

Richards H, Thomas CP, Bowen JL, Heard CM: In-vitro transcutaneous delivery of ketoprofen and polyunsaturated fatty acids from a pluronic lecithin organogel vehicle containing fish oil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58: 903–908, 2006

Rogers MA, Smith AK, Wright AJ, Marangoni AG: A Novel Cryo-SEM Technique for Imaging Vegetable Oil Based Organogels. *Journal of the American Chemists' Society* 84: 899–906, 2007

Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G: Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage* 6 Suppl A: 14–21, 1998

Roush JK, Dodd CE, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Schoenherr WD, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA: Multicenter veterinary practice assessment of the effects of omega-3 fatty acids on osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236: 59–65, 2010

Sagiri SS, Behera B, Rafanan RR, Bhattacharya C, Pal K, Banerjee I, Rousseau D: Organogels as matrices for controlled drug delivery: A review on the current state. *Soft Materials* 12: 47–72, 2014

Sahoo S, Kumar N, Bhattacharya C, Sagiri SS, Jain K, Pal K, Ray SS, Nayak B: Organogels: Properties and Applications in drug delivery. *Designed Monomers and Polymers* 14: 95–108, 2011

Salovaara S: VL: Contact Us Form Submitted [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Vilhelmiina Mikkola. Lähetetty 12.06.2014

Sam T, Ernest TB, Walsh J, Williams JL on behalf of the European Pediatric Formulation Initiative (EuPFI): A benefit/risk approach towards selecting appropriate pharmaceutical dosage forms – An application for pediatric dosage form selection. *International Journal of Pharmaceutics* 435: 115–123, 2012

- Scartazzini R, Luisi PL: Organogels from lecithins. *Journal of Physical Chemistry* 92: 829–833, 1988
- Schuleit M, Luisi PL: Enzyme Immobilization in Silica-Hardened Organogels. *Biotechnology and Bioengineering* 72: 249–253, 2001
- Schurtenberger P, Scartazzini R, Magid LJ, Leser ME, Luisi PL: Structural and dynamic properties of polymer-like reverse micelles. *Journal of Physical Chemistry* 94: 3695–3701, 1990
- Shaikh IM, Jadhav SL, Jadhav KR, Kadam VJ, Pisal SS: Aceclofenac organogels: In vitro and in vivo characterization. *Current Drug Delivery* 6: 1–7, 2009
- Shchipunov YuA: Lecithin organogel: a micellar system with unique properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 183–185: 541–554, 2001
- Shchipunov YA, Shumilina EV: Lecithin bridging by hydrogen bonds in the organogel. *Material Science and Engineering C* 3: 43–50, 1995
- Shchipunov YuA, Shumilina EV: Lecithin organogels: role of polar solvent and nature of intermolecular interactions. *Colloid Journal of the Russian Academy of Sciences: Kolloidnyi Zhurnal* 58: 117–125, 1996
- Shchipunov YA, Shumilina EV, Hoffmann H: Lecithin organogels with alkylglucosides. *Journal of Colloid and Interface Science* 199: 218–221, 1998
- Sheng JJ: Lecithin. *Kirjassa Handbook of Pharmaceutical excipients*, s.385–387, 6. painos. Toim. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington 2009
- Simonen M, 2011: Biofluksattujen bitumien ominaisuudet ja käyttö varastoitavissa pehmeissä asfalttibetonimassoissa. Diplomityö. Yhdyskunta- ja ympäristötekniikka. Aalto Yliopisto, Espoo.
- Stansby ME: Fish oils: Their chemistry, technology, stability, nutritional properties and uses. The Avi Publishing Company Inc, Westport 1967
- Stein S, Buggisch H: Rise of pulsating bubbles in fluids with a yield stress. *Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik* 80: 827–834, 2000
- Stenson WF, Cort D, Rodgers J, Burakoff R, DeSchryver-Kecskemeti K, Gramlich TL, Beeken W: Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Annals of Internal Medicine* 116: 609–614, 1992
- Sutton LM: Fwd: International Contact Us Form Submission [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Vilhelmiina Mikkola. Lähetetty 9.5.2014

Suzuki M, Hanabusa K: Polymer organogelators that make supramolecular organogels through physical cross-linking and self-assembly. *Chemical Society Reviews* 39: 455–463, 2010

Suzuki M, Nakajima Y, Yumoto M, Kimura M, Shirai H, Hanabusa K: *In situ* organogelation at room temperature: direct synthesis of gelators in organic solvents. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2: 1155–1159, 2004

SynergyLabs: Richard's Organics High Calorie Nutrient Paste for Cats 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: <http://synergylabs.com/?product=richards-organics/>

Sztukowski DM, Yarranton HW: Oilfield solids and water-in-oil emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 285: 821–833, 2005

TAInstruments: Understanding Rheology of Structured Fluids AAN016. Haettu 28.10.2014 Internetistä: [http://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN016\\_V1\\_U\\_StructFluids.pdf](http://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN016_V1_U_StructFluids.pdf)

TAInstruments: Ten Steps to a Better Rheological Measurement 2005. Power Point-diat. Haettu 28.10.2014 Internetistä: [http://www.chem.mtu.edu/~fmorriso/cm4655/TAInstruments/2013TA\\_10stepstogoodrheolmeasurements.pdf](http://www.chem.mtu.edu/~fmorriso/cm4655/TAInstruments/2013TA_10stepstogoodrheolmeasurements.pdf)

Tan A, Simovic S, Davey AK, Rades T, Prestidge CA: Silica-lipid hybrid (SLH) microcapsules: A novel oral delivery system for poorly soluble drugs. *Journal of Controlled Release* 134: 62–70, 2009

Teng YW, Zeisel SH: Choline. Kirjassa: Vitamins in the prevention of human diseases, s. 599–627, 1. painos. Toim. Herrmann W, Obeid R. Walter de Gruyter GmbH & Co, KG, Berlin/ New York, 2011

Terech P, Weiss RG: Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels. *Chemical Reviews* 97: 3133–3159, 1997

Tiwari S, Mitkare S, Bhangale P: Veterinary dosage forms: Review. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 6: 20–29, 2014

Tomlyn: Felovite II w/Taurine 2014. Haettu 8.5.2014 Internetistä: [http://www.tomlyn.com/pr\\_n\\_Felovite.cfm](http://www.tomlyn.com/pr_n_Felovite.cfm)

Verrips CT, Zaalberg J: The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 10: 187–196, 1980

Vintiloiu A, Leroux JC: Organogels and their use in drug delivery – A review. *Journal of Controlled Release* 125: 179–192, 2008

Volpi N: Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf®) and its constituents in healthy male volunteers. *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 768–777, 2002

Willard DM, Riter RE, Levinger NE: Dynamics of polar solvation in lecithin/water/cyclohexane reverse micelles. *Journal of the American Chemical Society* 120: 4151–4160, 1998

Willmann H, Walde P, Luisi PL, Gazzaniga A, Stroppolo F: Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81: 871–874, 1992

Wright AJ, Marangoni AG: Formation, structure, and rheological properties of ricinelaidic acid-vegetable oil organogels. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 497–503, 2006

Wright AJ, Marangoni AG: Vegetable Oil-based Ricinelaidic Acid Organogels – Phase Behavior, Microstructure, and Rheology. *Kirjassa Edible oleogels: structure and health implications*, s. 295–311, 1. painos, Toim. Marangoni AG, Garti N, AOCS Press, Urbana, 2011

Wu X-J, Wang Y, Yang W, Xie B-H, Yang M-B, Dan W: A rheological study on temperature dependent microstructural changes of fumed silica gels in dodecane. *Soft Matter* 8: 10 457–10 463, 2012

Yan D: Preparation and use of solidified oils 2004. US006773715 B1 20040810

Yani Y, Chow PS, Tan RBH: Molecular simulation study of the effect of various additives on salbutamol sulfate crystal habit. *Molecular Pharmaceutics* 8: 1910–1918, 2011

Yrjänäinen, L 2002: Pinta-aktiivisten aineiden rakenteiden ja ainesosien määra-suhteiden vaikutus emulsiovoiteen reologisiin ominaisuuksiin. Erikoistyöseminaari. Farmasian teknologian osasto. Farmasian laitos. Helsingin Yliopisto, Helsinki

Zainal Z, Longman AJ, Hurst S, Duggan K, Caterson B, Hughes CE, Harwood JL: Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 896–905, 2009

Zamaria N: Alteration of polyunsaturated fatty acids status and metabolism in health and disease (Review). *Reproduction Nutrition Development* 44: 273–282, 2004

Zhu G, Dordick JS: Solvent effect on organogel formation by low molecular weight molecules. *Chemistry of Materials* 18: 5988–5995, 2006

## LIITE 1

Esikokeissa valmistettujen näytteiden koostumus, valmistusolosuhteet, geeliytyminen sekä mahdollinen erottuminen. Lesitiinilaatuna esikokeissa on käytetty lesitiinilaatua 5. UT = Ultra Turrax. TS = Tehosekoitin. YK= Yleiskone.

Esi- koe	Piidiok- sidilaatu	Kala- öljy- laatu	Lesi- tiin määrä	Piidi- oksidin määrä	Sekoitus	Geeli (+/-)	Synereesi (+/-)
E1	A200VV	2	0,6 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	ei seurattu
E2	A200VV	3	0,6 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	+ (6.päivänä)
E3	A200VV	2	0,6 %	5 %	lasisauvalla	+	ei seurattu
E4	A200VV	1	0,6 %	5 %	lasisauvalla	+	ei seurattu
E5	A200VV	1	0,7 %	5 %	lasisauvalla	+	+ (4.päivänä)
E6	A200VV	1	0,7 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	+ (6.päivänä)
E7	A200VV	1	0,7 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 5 min	+	-
E8	A200VV	1	5 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	+ (6.päivänä)
E9	A200VV	2	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 30 sek	+	+ (5.päivänä)
E10	A200VV	2	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	-
E11	A200VV	3	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 30 sek	+	-
E12	A200VV	2	0,7 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 30 sek	+	-
E13	A200VV	2	0,7 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	+	-
E14	A200VV	3	0,7 %	5 %	UT, 17 000 rpm, 30 sek	+	-
E15	A200VV	1	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 2 min	-	ei geeliytynyt
E16	A200VV	1	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 5 min	-	ei geeliytynyt
E17	A200VV	1	1,9 %	5 %	lasisauvalla	+	ei seurattu
E18	A200VV	2	1,9 %	5 %	lasisauvalla	+	ei seurattu
E19	A200VV	3	1,9 %	5 %	lasisauvalla	+	ei seurattu
E20	A200VV	4	-	5 %	UT, 13 000 rpm, 10 min	-	ei geeliytynyt

E21	A200VV	4	-	5 %	UT, 17 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E22	A200VV	4	-	5 %	TS, nopeus 1, 5 min	+	+ (4.päivänä)
E23	A200VV	4	-	5 %	YK, nopeus 3, 10 min	-	ei geeliytynyt
E24	A200VV	4	-	5 %	YK, nopeus 7, 10 min	-	ei geeliytynyt
E25	A200VV	4	0,4 %	5 %	YK, nopeus 1, 5 + 2 min	+	+ (2.päivänä)
E26	A200VV	4	0,6 %	5 %	YK, nopeus 1, 5 + 2 min	+	+ (2.päivänä)
E27	A200VV	4	0,6 %	5 %	YK, nopeus 1, 5 + 5 min	+	+ (2.päivänä)
E28	A200VV	4	0,6 %	5 %	YK, nopeus 1, 5 + 10 min	+	+ (2.päivänä)
E29	A200VV	4	0,7 %	3 %	YK, nopeus 1, 5 + 5 min,	-	ei geeliytynyt
E30	A200VV	4	0,7 %	1 %	YK, nopeus 1, 5 + 5 min,	-	ei geeliytynyt
E31	A200VV	4	2 %	3 %	YK, nopeus 1, 5 + 5 min,	-	ei geeliytynyt
E32	A200VV	4	5 %	3 %	YK, nopeus 1, 5 + 5 min,	-	ei geeliytynyt
E33	A200VV	4	-	3 %	TS, nopeus 1, 1 min,	+	+ (4.päivänä)
E34	A200VV	4	-	1 %	TS, nopeus 1, 1 min,	-	ei geeliytynyt
E35	A200VV	4	0,7 %	5 %	TS, nopeus 1, 1 min + 30 sek	+	+ (2.päivänä)
E36	A200VV	4	-	7 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E37	A200VV	4	-	8 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	+	+ (9.päivänä)
E38	A200VV	4	-	9 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	+	+ (9.päivänä)
E39	A200VV	4	-	10 %	lasisauvalla	+	-
E40	A200VV	4	-	5 %	YK, nopeus 7, 30 min	-	ei geeliytynyt
E41	A200VV	4	-	7 %	YK, nopeus 1, 5min	-	ei geeliytynyt
E42	A200VV	4	-	8 %	YK, nopeus 1, 5 min	+	+ (7.päivänä)
E43	A200VV	4	-	9 %	YK, nopeus 1, 5min	+	+ (7.päivänä)

E44	A200VV	4	-	10 %	YK, nopeus 1, 5min	+	-
E45	AR972	4	-	5 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E46	A300	4	-	5 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E47	A200	4	-	5 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E48	A200VV	4	-	5 %	UT, 15 000 rpm, 15 min	-	ei geeliytynyt
E49	A200VV	4	0,6 %	5 %	YK, nopeus 1, 3+2 min	+	+ (4.päivänä)
E50	A200VV	4	0,6 %	5 %	YK, nopeus 1, 2+3 min	+	+ (4.päivänä)